

AKTIVITÄTSUNTERSUCHUNGEN AN  
CHLOROPLASTENPARTIKELN UND CHLORO-  
PLASTENSUBPARTIKELN AUS SYNCHRONI-  
SIERTEN ZELLEN VON SCENEDESMUS OBLIQUUS

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg

von  
Volker Mell  
aus Melsungen

Marburg/Lahn 1976

1977



AKTIVITÄTSUNTERSUCHUNGEN AN  
CHLOROPLASTENPARTIKELN UND CHLORO-  
PLASTENSUBPARTIKELN AUS SYNCHRONI-  
SIERTEN ZELLEN VON SCENEDESMUS OBLIQUUS

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg

von  
Volker Mell  
aus Melsungen

Marburg/Lahn 1976

Von dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität  
Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am 20. 12. 76  
Tag der mündlichen Prüfung: 13. 1. 77  
Berichterstatter: Prof. Dr. H. Senger  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Thauer

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                      | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. EINLEITUNG                                                                                        | 1     |
| 2. ALLGEMEINER TEIL                                                                                  | 3     |
| 2.1. Synchronkulturen                                                                                | 3     |
| 2.1.1. Wachstumscharakteristika von Synchronkulturen                                                 | 3     |
| 2.1.2. Die Photosyntheseleistung von Synchronkulturen                                                | 3     |
| 2.1.3. Messung der Photosystem II-Aktivität                                                          | 4     |
| 2.1.4. Untersuchungen der PS I-Aktivität                                                             | 5     |
| 2.1.5. Die Elektronentransportkette                                                                  | 6     |
| 2.1.6. Änderungen der Pigmentkonzentrationen und der Chloroplastenstruktur                           | 8     |
| 2.1.7. Die Dunkelreaktionen                                                                          | 10    |
| 2.2. Anordnung und Zusammensetzung der Photosysteme                                                  | 11    |
| 2.2.1. Die Isolation der Photosysteme                                                                | 11    |
| 2.2.2. Beschreibung der PS I-Partikel                                                                | 14    |
| 2.2.3. Beschreibung der PS II-Partikel                                                               | 16    |
| 2.2.4. Die Organisation und Isolation der Photosysteme bei Algen                                     | 17    |
| 3. ZIELSETZUNG                                                                                       | 23    |
| 4. METHODISCHER TEIL                                                                                 | 25    |
| 4.1. Objekte und Anzucht                                                                             | 25    |
| 4.2. Die Bestimmung von Versuchsparametern                                                           | 27    |
| 4.3. Chromatographische Trennung, Identifikation und quantitative Analyse der Pigmentzusammensetzung | 28    |
| 4.4. Die Bedingungen der Chloroplastenpartikelpräparation                                            | 31    |

|                                                                                                 | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4.5. Herstellung und Trennung von Chloroplasten-Subpartikeln                                    | 34    |
| 4.6. Die polarographische Messung des Sauerstoffumsatzes bedingt durch Photosynthese-Reaktionen | 37    |
| 4.6.1. Messung der Photosyntheserate                                                            | 38    |
| 4.6.2. Messung der Hill-Reaktion                                                                | 38    |
| 4.6.3. Messung der PS I-Aktivität                                                               | 38    |
| 4.7. Die Messung der Hill-Reaktion als Entfärbung von DCPIP                                     | 39    |
| 4.8. Bestimmung des Chl/P 700-Verhältnisses im Chloroplastenpartikelhomogenat                   | 41    |
| 4.9. Fluoreszenz-Anregungs-Messungen                                                            | 41    |
| 4.10. Die Messung von Absorptionsspektren bei Zimmer- und Tieftemperatur (77° K)                | 42    |
| 5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION                                                                    | 44    |
| 5.1. Bestimmung der Eigenschaften der Chloroplastenpartikel                                     | 44    |
| 5.1.1. Die Abhängigkeit der photosynthetischen Teilreaktionen vom pH-Wert                       | 44    |
| 5.1.1.1. Die Abhängigkeit der PS II-Aktivität vom pH-Wert                                       | 45    |
| 5.1.1.2. Die Abhängigkeit der PS I-Aktivität vom pH-Wert                                        | 53    |
| 5.1.2. Der Einfluß der Konzentration der Hill-Reagenzien auf die Aktivität                      | 56    |
| 5.1.3. Die Abhängigkeit der photosynthetischen Teilreaktionen von der Aufbruchsdauer            | 59    |
| 5.1.3.1. Die PS II-Aktivität in Abhängigkeit von der Aufbruchsdauer                             | 59    |
| 5.1.3.2. Die PS I-Aktivität in Abhängigkeit von der Aufbruchsdauer                              | 63    |

|                                                                                                                                        | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 5.1.4. Die Abhängigkeit der Photosynthese-<br>reaktion vom Alter der Partikel                                                          | 64    |
| 5.1.5. Die Kapazität von Teilreaktionen der<br>Photosynthese während des Entwicklungs-<br>zyklus                                       | 66    |
| 5.2.1. Messung von PS II-Reaktionen                                                                                                    | 66    |
| 5.2.2. Messung von PS I-Reaktionen                                                                                                     | 72    |
| 5.2.3. P-700-Bestimmungen zur 8. und 16.<br>Stunde des Entwicklungszyklus                                                              | 77    |
| 5.2.4. Zusammenfassung der vergleichenden<br>Messungen zur 8. und 16. Stunde des<br>Entwicklungszyklus                                 | 81    |
| 5.3. Herstellung und Isolation von Chloro-<br>plastensubpartikeln aus Zellen der<br>8. und 16. Stunde                                  | 82    |
| 5.3.1. Die Auswahl der Desintegrationsmethode                                                                                          | 82    |
| 5.3.2. Die Wirkung von Digitonin                                                                                                       |       |
| 5.3.3. Vergleichende Charakterisierung digitonin-<br>behandelter Chloroplastenpartikel der<br>8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus | 88    |
| 5.3.3.1. Die Auftrennung im Saccharose-Dichte-<br>gradienten                                                                           | 88    |
| 5.3.3.2. Die Aktivität der Chloroplastensub-<br>partikel in Teilreaktionen der Photo-<br>synthese                                      | 90    |
| 5.3.3.3. Die Pigmentzusammensetzung in den<br>Subpartikeln                                                                             | 99    |
| 5.3.3.4. Vergleich der Absorptionsspektren und<br>der Anregungsspektren der Fluoreszenz-<br>emission                                   | 111   |
| 6. Schlußfolgerungen                                                                                                                   | 126   |
| 7. Zusammenfassung                                                                                                                     | 134   |
| 8. Literaturverzeichnis                                                                                                                |       |

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende  
Abkürzungen verwendet:

|                         |                                                                     |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Asc.                    | Ascorbat                                                            |
| Cyt b <sub>559</sub>    | Cytochrom b <sub>559</sub>                                          |
| Cyt b <sub>559</sub> HP | Cytochrom b <sub>559</sub> - high potential                         |
| Cyt b <sub>559</sub> LP | Cytochrom b <sub>559</sub> - low potential                          |
| DAD                     | 2,2,5,6 -Tetramethyl-p-phenylendiamin                               |
| DBMIB                   | 2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-<br>benzochinon                   |
| DC                      | Dünnschichtchromatographie                                          |
| DCMU                    | 3-(3,4-dichlorphenyl)-1, 1-Dimethyl-<br>harnstoff                   |
| DCPIP                   | 2,6-Dichlorphenolindophenol                                         |
| DPC                     | Diphenylcarbazon                                                    |
| E <sub>0</sub>          | Redoxpotential bei pH 7                                             |
| EDTA                    | Dinatriumsalz der Äthylendiamintetra-<br>essigsäure                 |
| KH                      | Kohlehydrate                                                        |
| LDW                     | Licht-Dunkel-Wechsel                                                |
| MV                      | Methylviologen                                                      |
| NADP                    | Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat                             |
| P 700                   | Chlorophyll a <sub>I</sub> im Reaktionszentrum von<br>Photosystem I |
| pBQ                     | p-Benzochinon                                                       |
| PC                      | Plastocyanin                                                        |
| PCV                     | packed cell volume (dichtest ge-<br>packtes Zellvolumen)            |
| PQ                      | Plastoquinon                                                        |
| PS I                    | Photosystem I                                                       |
| PS I <sub>S</sub>       | Photosystem I aus Stromathylakoiden                                 |
| PS I <sub>G</sub>       | Photosystem I aus Granathylakoiden                                  |
| PS II                   | Photosystem II                                                      |
| Q                       | Quencher, Primärakzeptor von PS II                                  |

## 1. Einleitung

O. WARBURG führte 1919 Chlorella als Versuchsobjekt in die Photosyntheseforschung ein und inzwischen werden Massenkulturen einzelliger Algen vielfach angewandt.

In solchen Massenkulturen können nun je nach Anzuchtbedingungen alle Entwicklungsstadien der Zellen statistisch verteilt sein oder bestimmte Altersstadien überwiegen. Setzt man aber voraus, daß sich während des Entwicklungszyklus der Zelle ihre physiologische Aktivität ändert, so kann es im zweiten Fall in den Ergebnissen gleichartiger Messungen zu Diskrepanzen kommen. Die Anforderung an den induktiv vorgehenden Biologen, reproduzierbar zu arbeiten, kann durch solche Aktivitätsschwankungen erschwert werden. Die Anwendung von Synchronkulturen ermöglicht es heute, derartige Schwierigkeiten zu umgehen.

Unter Synchronisation einer Population von Mikroorganismen versteht man die Gleichschaltung der Entwicklungsabläufe aller ihrer Individuen. Eine solche Synchronkultur stellt einen Parameter für den Entwicklungsablauf einer einzelnen Zelle dar, gleichgültig aus wieviel Individuen sie besteht.

Der ersten Synchronisation einer Massenkultur von Chlorella durch TAMIYA et al. (1953) folgte eine intensive Entwicklung der Synchronisationsmethoden. Der Wechsel von Licht- und Dunkelphasen erwies sich für photoautotrophe Mikroorganismen als wirksamstes Prinzip und inzwischen sind Vertreter systematisch unterschiedlicher Algenklassen synchronisiert worden. Eine Übersicht der Synchronisationsmethoden und der synchronisierten Arten geben Arbeiten von TAMIYA (1966), PIRSON und LORENZEN (1966), LORENZEN (1970), LORENZEN und HESSE (1974) und SENGER (1975).

Das Anwendungsspektrum für Synchronkulturen ist groß, so können z.B. molekularbiologische Fragen direkt an Massenkulturen bearbeitet werden. Strukturelle Änderungen während des Zellzyklus werden elektronenmikroskopisch erfaßbar, da jetzt das Zellstadium jeder Zelle des Präparates bekannt ist. Bestimmte Enzyme, die im Leben einer Alge nur kurzzeitig, dann aber in hoher Konzentration auftreten, werden nachweisbar bzw. isolierbar (SCHLÖSSER et al., 1976; FELLER, 1975). Die Photosynthese im weitesten Sinne gehört aber wohl zu den am intensivsten mit synchronen Algenkulturen untersuchten Problemen und ist Gegenstand dieser Arbeit.

Einige Methoden der modernen Photosyntheseforschung sind auf den Einsatz artifizieller Substanzen angewiesen. Der Versuch, diese Methoden auf Algen zu übertragen, scheiterte oft an der geringen Permeabilität der Zellwand für Inhibitoren (SENGER, 1976), Elektronendonatoren und -akzeptoren oder auch Antikörpern. Dieses Problem kann in Zukunft entweder durch die Wahl zellwandloser Objekte umgangen werden (LIEN und KNUTSEN, 1976; CATTOLICO et al., 1976), oder es müssen Chloroplasten bzw. Chloroplastenpartikelpräparationen hergestellt werden.

Der zuletzt genannte Weg ist für synchrone Kulturen von Scenedesmus obliquus beschriftet worden.

## 2.     Allgemeiner Teil

### 2.1.   Synchronkulturen

#### 2.1.1. Wachstumscharakteristika von Synchronkulturen

Die meisten Synchronkulturen wachsen unter einem LDW von ca. 24 Stunden Dauer. Die Größe der Zellen, das PCV, das Trockengewicht und der Chlorophyllgehalt der Kultur steigen in der Lichtphase gleichsinnig an, während die ZZ konstant bleibt. In der Dunkelzeit steigt die ZZ sprunghaft, entsprechend der spezifischen Autosporenzahl an, die Größe der Zellen nimmt reziprok ebenso sprunghaft ab, während sich PCV, Trockengewicht und Chlorophyllgehalt nur wenig ändern. Eine zusammenfassende Übersicht geben die Artikel von PIRSON und LORENZEN (1966), TAMIYA (1966), LORENZEN (1970), LORENZEN und HESSE (1974), SENGGER (1975). Die Ergebnisse von Untersuchungen an Synchronkulturen sind sehr stark von der angewandten Synchronisationsmethode und der Synchronisationsschärfe abhängig, entsprechend hoch sind die Anforderungen an die Qualität der Synchronisation (SENGGER und BISHOP, 1969).

#### 2.1.2. Die Photosyntheseleistung von Synchronkulturen

Die Photosyntheseleistung von Synchronkulturen kann als Sauerstoffproduktion, Kohlendioxidaufnahme oder Stoffproduktion (z.B. KH, Trockengewicht) gemessen werden. Bei Grünalgen zeigt sich generell ein Anstieg der Photosyntheseleistung in der ersten Hälfte der Lichtzeit und eine anschließende Abnahme bis zum Minimum kurz vor der Autosporenfreisetzung (LORENZEN, 1970; SENGGER, 1975).

Bei Cyanidium caldarium, einer Rhodophyceae, liegt das Maximum der  $O_2$ -Produktion zu Beginn der Dunkelphase eines 24:24 LDW (MÖLLER und SENGGER, 1972). Bei Bumilleriopsis filiformis, einer Xanthophyceae, die ebenfalls in einem 48-stündigen Zellzyklus wächst, liegt das Minimum der Photosynthese-Aktivität in der 34. Stunde vor dem Maximum, das zwischen der 39. und 41. Stunde folgt (HESSE, 1974). Da Bumilleriopsis filiformis in einem kombinierten Licht-Schwachlicht-Temperatur-Wechsel (33. Std. bei 15 000 Lux/24°C: 15. Std. bei 3 000 Lux/19°C) in unsterilen Kulturen wächst, ist ein Vergleich mit den Ergebnissen synchroner Grünalgen allerdings nur bedingt möglich.

Messungen mit Chloroplastenpartikeln, die beide Photosysteme und die Elektronentransportkette gleichzeitig erfassen ( $H_2O \longrightarrow NADP$ ) sind nur mit Bumilleriopsis filiformis (HESSE et al., 1976) durchgeführt worden. Die Änderungen gleichen denen, die mit intakten Zellen gemessen wurden.

Messungen im lichtlimitierten Bereich der Photosynthese (SOROKIN und KRAUSS, 1961; SENGGER und BISHOP, 1967) bestätigen die rhythmisch schwankenden Photosynthesekapazitäten ebenso, wie die Messung der Quantenausbeute während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus (SENGGER und BISHOP, 1967 und 1969; SENGGER, 1970 b und 1971).

### 2.1.3. Messung der Photosystem II-Aktivität

Die Aktivität von Photosystem II kann mit der Hill-Reaktion und der Fluoreszenz gemessen werden. Die Hill-Reaktion kann an intakten Algenzellen nur mit p-Benzochinon gemessen werden, da nur dieses Hill-Reagenz in der Lage ist, die Zellwand zu permeieren. In allen unter 2.2. genannten Systemen schwankt die Aktivität der Hill-Reaktion parallel zur

### Photosynthese.

Diese Befunde konnten mit Chloroplastenpartikelpräparationen von Chlamydomonas (SCHOR et al., 1970), Chlorella (NELLE et al., 1975), Scenedesmus (FRICKEL-FAULSTICH und SENGER, 1974; SENGER und MELL, 1976) und Bumilleriopsis (HESSE et al., 1976) bestätigt werden. In diesen zellfreien Systemen konnten zusätzlich Hill-Reagenzien eingesetzt werden, mit denen eine Messung an ganzen Zellen nicht möglich ist. NELLE et al. (1975) setzten bei der Messung den Elektronendonator DPC als Ersatz für das geschädigte, wasserspaltende System ein.

Die Hill-Reaktion gestattet aber keine Aussage darüber, ob die Schwankungen der Aktivität durch Änderungen im PS II selbst, oder in einem Redoxsystem vor oder hinter PS II zustande kommen. Die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzinduktion (Kautsky-Effekt) sind zwei weitere Möglichkeiten, die PS II-Aktivität zu messen.

Der Kautsky-Effekt, von BAUER (1972) näher untersucht, und die anschließende stationäre Fluoreszenz deuten bei Scenedesmus obliquus auf einen schlechteren Elektronentransport, d.h. eine verminderte Reoxidation von Q hin (FRICKEL-FAULSTICH und SENGER, 1974).

#### 2.1.4. Untersuchungen der PS I-Aktivität

Der Atavismus einiger Grünalgen, unter Wasserstoffatmosphäre Hydrogenase zu aktivieren (GAFFRON, 1940) und molekularen Wasserstoff als Elektronendonator für PS I zu nutzen, war lange Zeit die einzige Möglichkeit, an Algen PS I isoliert zu messen. Die Photoreduktion von  $\text{CO}_2$  mittels  $\text{H}_2$  benötigt nur die von PS I absorbierte Lichtenergie.

Die Messungen an Synchronkulturen ergaben differierende Ergebnisse (vergl. SENGER, 1975): Scenedesmus und Chlorella zeigen kaum Aktivitätsunterschiede

(4%), während Chlamydomonas-Zellen zur 16. Std. 26% weniger aktiv sind.

Ähnlich differierend sind die Ergebnisse, die an Chloroplastenpartikeln gemessen werden:

FRICKEL-FAULSTICH und SENGER (1974) beobachten an Scenedesmus-Chloroplastenpartikeln keine Schwankungen der Sauerstoffaufnahme (Asc./DCPIP → MV), bei Chlamydomonas wird eine um 40% geringere Aktivität zur 16. Std. gemessen. Dieses Ergebnis gleicht Messungen von SCHOR et al. (1970), die an 16. Std. Chlamydomonas-Chloroplastenpartikeln ca. 50% geringere Aktivität erreichen.

Für Chlorella liegen ähnliche Resultate von NELLE et al. (1975) vor. Die Chlorella-Chloroplastenpartikel transportieren zur 16. Std. ca. 56% weniger Elektronen (Asc./DCPIP → MR) als zur 8. Std. des Entwicklungszyklus. HESSE et al. (1976) berichteten eine um 38% geringere Aktivität des Elektronentransports bei Asc./DAD → MV für Bumilleriopsis filiformis.

## 2.1.5. Die Elektronentransportkette

Änderungen in den Gliedern der Elektronentransportkette während des Entwicklungszyklus einzelliger Grünalgen wurden bisher nur an den Grünalgen Scenedesmus und Chlamydomonas (FRICKEL-FAULSTICH, 1974; FRICKEL-FAULSTICH und SENGER, 1974; SCHOR et al., 1970) und der Xanthophyceae Bumilleriopsis (HESSE et al., 1977) untersucht. Die untersuchten Redoxglieder liegen zwischen den beiden Photosystemen. Fluoreszenzinduktions-Messungen (Kautsky-Effekt) zeigen für Chlamydomonas und Scenedesmus keine Veränderungen der Poolgröße des Quenchers Q. Bei Chlamydomonas deutet die Titration mit DBMIB bzw. DCMU auf eine Verkleinerung des aktiven Plastochinonpools (PQ) zur 16. Std. des Zellzyklus hin, für Scenedesmus

liegen wegen der Permeationsprobleme keine derartigen Ergebnisse vor. Die quantitativen Analysen der PQ-Mengen ergeben für die Gesamtmenge an PQ eine Abnahme von 11% bei Scenedesmus und bei Chlamydomonas. Davon entfielen auf das im Dunkeln oxidiert vorliegende PQ bei Chlamydomonas 7% und bei Scenedesmus nahm PQ sogar um 4% zu. Die Fluoreszenzlöschung erfolgt aber durch PQ<sub>ox.</sub>. Die Cytochrombestimmungen von FRICKEL-FAULSTICH (1974) wurden nach der von BENDALL et al. (1971) beschriebenen Methode vorgenommen. Cytochrom f<sub>554</sub>, Cytochrom b<sub>563</sub> und die Gesamtmenge von Cytochrom b<sub>559</sub> ändern sich bei Scenedesmus nicht vergleichbar mit der Photosynthesekapazität (-10%; + 15% - 10%), bei Chlamydomonas ist die Änderung aber um 31% - 38% in ähnlicher Größenordnung wie die Photosynthese.

SCHOR et al. (1970) haben nur Cytochrom b<sub>563</sub> und Cytochrom f<sub>554</sub> + Cytochrom b<sub>559</sub> an Chlamydomonas bestimmt. Zur 16. Std. sind 42% bzw. 45% weniger Cytochrome vorhanden. Ohne näher auf die noch nicht abgeschlossene Diskussion um die genaue Funktion und Stellung von Cytochrom b<sub>559</sub> -High Potential (Cyt. b<sub>559</sub> HP) bzw. Cytochrom b<sub>559</sub> -Low Potential (Cyt. b<sub>559</sub> LP) eingehen zu wollen (vgl. FLEISCH-HACKER, 1975), sollen trotzdem kurz die beschriebenen Änderungen erwähnt werden.

Cyt. b<sub>559</sub> wird allgemein in die Nähe von PS II gestellt und auch in PS II-Partikeln gefunden (BOARDMAN und ANDERSON, 1967). Diese HP-Form des Cyt. b<sub>559</sub> ist sowohl bei Scenedesmus als auch bei Chlamydomonas in der 16. Stunde des Entwicklungszyklus zu 36% weniger vorhanden als zur 8. Std. Die LP-Form des Cyt. b<sub>559</sub> verringert sich bei Chlamydomonas sogar um 42%. Bei Scenedesmus steigt sie dagegen auf 148% zur 16. Stunde.

Die Befunde sind also recht heterogen. Bei Chlamy-

domonas ist die Menge aller untersuchten Redox-Glieder zur 16. Std. um 31-45% geringer, die Photosynthesekapazität sinkt um 50%. Bei Scenedesmus sinkt nur die HP-Form des Cyt b<sub>559</sub> um 36%, alle anderen Redox-Glieder verringern ihre Konzentration um höchstens 11%. Die Photosynthesekapazität verringert sich um 38%.

#### 2.1.6. Änderungen der Pigmentkonzentrationen und der Chloroplastenstruktur

Die Änderungen der Pigmentkonzentrationen und der Chloroplastenstruktur sind bisher an Synchronkulturen nur wenig untersucht worden. So beschreibt SÖDER (1964) die Teilung von Chlorella, bei der die neuen Zellwände immer in "Lücken" zwischen Chloroplastenabschnitten treffen, und ähnlich beschreiben OSAFUNE et al. (1972) die Teilung bei Chlamydomonas, aber auf Strukturänderungen während des Entwicklungszyklus gehen beide nicht ein. SÖDER berichtet lediglich, daß in Zellen im mittleren Entwicklungsstadium, 46 Prozent der Thylakoide 3er-Stapel bilden.

DAS (1975) untersucht synchrone Scenedesmus-Zellen und bestimmt bei Zellen der 5. Stunde nach Lichtbeginn die Dicke der Thylakoide mit 165 Å und bei Zellen vor der Teilung auf 70-90 Å.

Untersuchungen der Pigmentkonzentrationen synchroner Grünalgen beschränken sich meistens auf die Chlorophylle und die Summe der Carotinoide.

Das Verhältnis von Chlorophyll/Trockengewicht ist z.B. bei Scenedesmus (SENGER, 1970a), Chlorella pyrenoidosa (LORENZEN, 1959) und Chlamydomonas (FRICKEL-FAULSTICH, 1974) konstant, ändert sich aber bei Chlorella ellipsoidea (TAMIYA, 1964).

Das Chlorophyll a/b-Verhältnis bleibt bei Scenedesmus (SENGER, 1970 a) und Chlorella ellipsoidea (TAMIYA,

1964) konstant, ändert sich aber bei Chlorella pyrenoidosa (NELLE et al., 1975). FRANCIS et al. (1975) untersuchen detailliert die "Variations in the carotenoid content of Chlamydomonas reinhardtii throughout the Cell Cycle". Das Verhältnis Chlorophyll /Gesamtcarotinoide bleibt ebenso konstant wie bei Scenedesmus (SENGER, 1970 a). Die Untersuchung der einzelnen Carotinoide zeigt aber, daß einige Carotinoide früher (Lutein und Violaxanthin-Luteoxanthin), andere später (Neoxanthin) als der Durchschnitt synthetisiert werden. Eine Erklärung für diese Phänomene ist noch nicht möglich.

Das Zusammenwirken von Pigmenten und Struktur bedingt die für die Photosynthese wichtige Energieübertragung. Wie bereits erwähnt, ist die Fluoreszenz ein geeignetes Mittel, diese Energieübertragung innerhalb der Pigmente zu untersuchen (vergl. PAPA-GEORGIOU, 1975). In Fluoreszenzanregungsspektren wird die Effektivität sichtbar, mit der die eingestrahlte Energie unterschiedlicher Wellenlänge auf die zentralen Chlorophyll a-Moleküle übertragen werden, deren Rot-Fluoreszenz bei ca. 684 nm gemessen wird (BORARDMAN et al., 1966).

NELLE et al. (1975) messen bei Chlorella eine sich über den Zyklus ändernde Energieübertragung von Chlorophyll b ( 470 nm) auf Chlorophyll a.

Die Zunahme der Chlorophyll b-abhängigen Fluoreszenz zur 16. Stunde des Entwicklungszyklus ordnen sie der geringeren PS II-Aktivität zu, da Chlorophyll b bevorzugt PS II anregen soll (YENTSCH und GUILLARD, 1969). SENGER und BISHOP (1971) zeigen, daß sich die Absorptionsspektren ganzer Zellen von Scenedesmus zur 8. Std. bzw. 16. Std. des Entwicklungszyklus nicht signifikant unterscheiden, d.h. die Pigmentzusammensetzung bleibt gleich: zur 8. Std. ist aber die Quantenausbeute der Photosynthese höher bzw. die Fluoreszenz niedriger als zur 16. Stunde

## 2.1.7. Die Dunkelreaktionen

Neben den Lichtreaktionen der PS könnten prinzipiell auch die enzymatischen Dunkelreaktionen die begrenzenden Schritte bei der Regulation der PS-Kapazität während des Entwicklungszyklus sein. WISSIG (1976) konnte für synchrone Scenedesmus-Kulturen zeigen, daß die Ribulose-1,5-diphosphatcarboxylase keine Aktivitätsänderungen aufweist. Auch bei Chlamydomonas bleibt die Enzymaktivität pro Protein konstant (IWANIJ et al., 1975); die gleichen Untersuchungen ergaben ebenfalls, daß die Untereinheiten der Carboxydismutase z.T. im Cytoplasma und z.T. im Chloroplasten synthetisiert werden. Dennoch scheint die Aktivität z.B. durch die Lichtintensität beeinflussbar (MOLLOY und SCHMIDT, 1970). DÖHLER (1974) konnte bei Chlorella vulgaris einen Wechsel des Carboxylierungsweges nachweisen. Autosporen-mutterzellen fixieren Kohlendioxid über den  $C_4$ -Weg, Autosporen über den Calvin-Zyklus.

Die NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und die Aldolase durchlaufen ein Maximum während der Lichtzeit und erreichen während der Dunkelzeit wieder die Anfangsaktivität der 0. Stunde (BERGER, 1968). Für die NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in Ankistrodesmus braunii konnte THEIB-SEUBERLING (1975) noch einen zusätzlichen, lichtaktivierbaren Anteil feststellen.

Die wenigen vorliegenden Arbeiten lassen aber noch kein genaueres Bild über die Aktivitätsänderungen der Enzyme des Calvinzyklus zu. Die bisherigen Ergebnisse deuten aber darauf hin, daß in den Fällen, in denen Änderungen der Enzymaktivitäten gemessen wurden, diese den Änderungen der Photosyntheseaktivitäten folgen. Ob dabei die Dunkelreaktionen von den Lichtreaktionen gesteuert werden, oder ob beide Reaktionen von einem noch unbekannten

dritten System beeinflußt werden, ist ungeklärt.

## 2.2. Anordnung und Zusammensetzung der Photosysteme

Die in Abschnitt 2. "Synchronkulturen" geschilderten Reaktionen laufen in den Chloroplasten der Pflanzenzelle ab. Die Struktur, an die sie gebunden sind, sind die Thylakoide. Nachdem HILL und BENDALL (1960) das "Z-Schema" erstellten, begann eine intensive Erforschung der räumlichen Anordnung und der Zusammensetzung der beiden postulierten Photosysteme. Die Aussage und Interpretation der Ergebnisse sind stark von der Methode abhängig. Untersuchungen im Sinne der folgenden Kapitel wurden an synchronen Kulturen einzelliger Grünalgen bisher noch nicht und an homokontinuierlichen Kulturen vergleichsweise selten vorgenommen.

### 2.2.1. Die Isolation der Photosysteme

Das Ziel, die Photosysteme aus den Thylakoiden herauszulösen und anschließend zu isolieren, ist mit prinzipiell verschiedenen Methoden versucht worden. Die Chloroplasten, meist von Spinat, wurden entweder mechanisch (Ultraschall, French press) oder chemisch (Digitonin, Triton X-100) desintegriert und anschließend wurden die Bestandteile durch Differentialzentrifugation oder Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Diese Methoden sind von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen (Zusammenfassungen bei BOARDMAN, 1970; SANE und PARK, 1971; BROWN, 1973; ARNTZEN und BRIANTAIS, 1975; ANDERSON, 1975) beliebig kombiniert, sukzessive oder simultan angewandt worden, dennoch waren die Ergebnisse überraschend einheitlich.

BOARDMAN und ANDERSON (1964) fraktionierten Spinat-

chloroplasten mit Digitonin und Differential-zentrifugation in zwei Partikelgruppen. Die leichteren Partikel konnten keine Hill-Reaktion, aber noch NADP-Reduktion mit künstlichen Elektronendonoren, d.h. PS I-Reaktionen durchführen. Die schwereren "angereicherten PS II-Partikel" führten die Hill-Reaktion mit guten Raten durch, hatten aber nur noch wenig PS I-Aktivität.

1968 konnten JACOBI und LEHMANN aus Chloroplasten mit Ultraschall und spezifischen Salzkonzentrationen Stroma- und Granathylakoide trennen und zeigen, daß Stromathylakoide nur PS I enthalten, während die Granathylakoide PS I und PS II enthalten. Dieses Ergebnis wurde durch Versuche an Partikeln, die mit der French press (SANE et al., 1970) und durch Digitoninbehandlung von Chloroplasten (WESSELS und VAN LEEUWEN, 1970) erhalten wurden, bestätigt.

In allen Fällen kontrollierte man die biochemischen Methoden elektronenmikroskopisch; die sukzessive Desintegration von Spinatchloroplasten bei steigender Digitoninkonzentration war bereits 1962 durch WEHRMEYER gezeigt worden und wurde 1971 von GOODCHILD und PARK bestätigt. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten SANE und PARK (1971) ein Modell auf, das prinzipiell für granahaltige, "typische" Chloroplasten höherer Pflanzen auch heute noch gilt (Abb. 1).

Die Stroma und die äußeren Granathylakoide enthalten demnach nur PS I, während in den Granathylakoiden PS I und PS II vorhanden sind. Funktionell bedeutet dies, daß in den Stromathylakoiden nur zyklische Photophosphorylierung ablaufen kann und der nichtzyklische Elektronentransport auf die Granathylakoide beschränkt ist. Versuche von ARNTZEN et al. (1970) bestätigen diese Befunde. HAEHNEL (1976) konnte an Spinat-Chloroplasten zeigen, daß nur 75% aller Chlorophyll  $a_1$

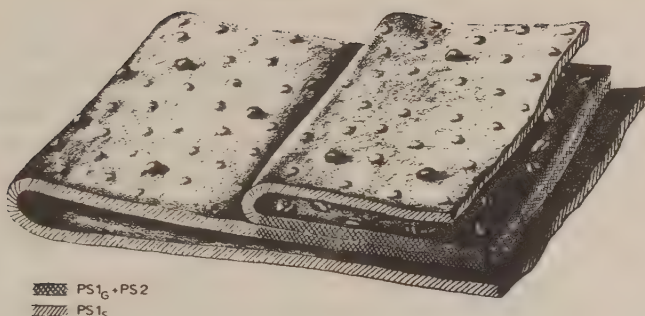


Abb. 1: Das Schema zeigt die Verteilung der Photosysteme in Grana- und Stromathylakoiden. Die einfach schraffierte Region enthält nur kleine Partikel und nur PS I-Aktivität. Die doppelt schraffierte Region enthält große und kleine Partikel sowie PS I- und PS II-Aktivität (aus PARK und SANE, 1971).

(=P-700)-Moleküle mit PS II über PQ verbunden sind. Die restlichen 25% der Chlorophyll  $a_I$ -Moleküle sind funktionell von PS II isoliert und sollen in den Stromathylakoiden lokalisiert sein. Diese Befunde werden von SANE et al. (1970) und ARNTZEN et al. (1972) bestätigt, die zeigen konnten, daß sich 30-35% des Chlorophyll  $a_I$  in den PS II-freien Stromathylakoiden befindet. Auch dieses für Grana-enthaltende Chloroplasten entwickelte Modell ist nicht zweifelsfrei, denn in einigen cytochemischen Experimenten (HALL et al., 1972) wurde die Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat (III) in Grana- und Stromathylakoiden nachgewiesen.

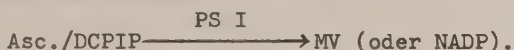
### 2.2.2. Beschreibung der PS I-Partikel

Nach dem Modell von SANE und PARK (Abb. 1) können also zwei räumlich getrennte Photosysteme I unterschieden werden, ein PS I aus den Stromathylakoiden (PS I<sub>S</sub>) und ein PS I aus den Granathylakoiden (PS I<sub>G</sub>). Die Ergebnisse vergleichender Untersuchungen der beiden Photosysteme I zeigten z.T., daß sie unterschiedlich sind, z.T. daß sie gleich sind.

SANE et al. (1970) stellen zwischen PS I<sub>G</sub> und PS I<sub>S</sub> Größenunterschiede fest. GASANOV und GOVINDJEE (1974) und GAZANCHYAN et al. (1975) finden ein höheres Verhältnis der Fluoreszenzemission 685/735 nm bei den PS I aus den Granathylakoiden. WESSELS und BORCHERT (1974) können die anfangs von WESSELS und VOORN (1972) gefundenen Unterschiede zwischen PS I<sub>G</sub> und PS I<sub>S</sub> im Chl/P-700 und Chlorophyll a/b-Verhältnis auf Verunreinigungen im Trennungsgang zurückführen. Ebenso findet ARNTZEN et al. (1972) keine wesentlichen Unterschiede, wenn sie die üblichen Parameter berücksichtigen. In einem interessanten Rekonstitutionsexperiment können sie aber isolierte PS II-Partikel mit isolierten PS I-Partikeln rekombinieren und erhalten eine DPC-abhängige NADP-Reduktion; mit PS I<sub>S</sub>-Partikeln gelingt ihnen dies nicht. In Pigment-Protein-Arbeiten (THORNBERRY, 1975) werden keine unterschiedlichen Pigment-Protein I-Komplexe referiert. Eine endgültige Klärung dieser Frage steht also noch aus, doch die Ergebnisse weisen eher auf strukturelle als auf funktionelle Unterschiede zwischen PS I<sub>G</sub> und PS I<sub>S</sub> hin.

Die allgemeine Isolierung von PS I-Partikeln ohne Differenzierung nach PS I<sub>G</sub> bzw. PS I<sub>S</sub> und ohne Kontaminierung durch PS II-Anteile ist relativ problemlos und bereits BOARDMAN 1964 gelungen.

Entsprechend hoch ist die Anzahl der Arbeiten, die PS I-Partikel zum Thema haben. Ohne näher auf die einzelnen Arbeiten einzugehen, seien hier die Hauptmerkmale der PS I-Präparate genannt: Die PS I-Isolate enthalten relativ leichte, kleine Partikel mit erhöhtem Chlorophyll a/b-Verhältnis (4 bis 8). Sie besitzen keine Hill-Aktivität, haben aber hohe Raten in den Reaktionen



Die NADP-Reduktion bedarf der Zugabe von Ferredoxin und der Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase. Bei Belichtung tritt Cyt.  $f_{554}$  und  $P_{700}$ -Oxidation und Cyt.  $b_{563}$ -Reduktion ein. In Pigment-Protein-Komplexen 1, die mit SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese isoliert werden, fehlen die Cytochrome.

Das Verhältnis Chlorophyll/ $P_{700}$  hängt von der Präparationsmethode ab. Bei "normalen" PSI-Partikeln beträgt es 100:1 bis 200:1 (vergl. Tab. 1, Vernon et al., 1971). Die hochgereinigten PS I-Partikel (HP 700) von VERNON et al. erreichen ein Verhältnis von etwa 30. Voraussetzung ist jedoch, daß vorher die Carotinoide durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, oder daß mit carotinoidfreien Mutanten gearbeitet wird. Diese hohe  $P_{700}$ -Konzentration entspricht etwa den  $P_{700}$ -Chlorophyll a-Protein-Komplexen (THORNER, 1975). Beide Präparationen zeigen auch, daß im "Reaction Center Complex" (vergl. VERNON et al., 1971) kein Chlorophyll b vorhanden ist.

Die  $P_{700}$ -Chlorophyll a-Proteine haben ein Molekulargewicht von ca. 110 000 und enthalten 14 Chlorophyll-a-Moleküle. Bei einem gemessenen Chl/ $P_{700}$ -Verhältnis von ca. 40 bedeutet dies, daß nur jeder dritte Pigment-Protein-Komplex ein  $P_{700}$ -Chlorophyll enthält.

### 2.2.3. Beschreibung der PS II-Partikel

Der relativ einfachen Isolation von PS I-Partikeln steht eine schwierige Isolation des Photosystems II gegenüber; entsprechend gering sind die Informationen über das Photosystem II.

Die PS II-Partikel enthaltenden Präparate aller Arbeitsgruppen ähnelten einander, gleichgültig ob die Chloroplasten mit Digitonin (z.B. ANDERSON und BOARDMAN, 1966), Triton X-100 (VERNON und SHAW (1965), Ultraschall (JACOBI, 1967) oder mit der French press (MICHEL und MICHEL-WOLWERTZ, 1969) desintegriert wurden: Das Chlorophyll a/b-Verhältnis war mit 2 bis 2,5 kleiner als das der Chloroplasten, und die PS I-abhängigen Reaktionen waren deutlich erniedrigt. Die Hill-Reaktionen waren meistens ebenfalls geringer, was auf eine Schädigung des wasserspaltenden Systems zurückgeführt wurde. Mit DPC als Elektronendonator anstelle des Wassers konnten meist höhere PS II-Aktivitäten erreicht werden. Eine Zusammenfassung dieser Arbeiten gibt BOARDMAN (1970).

OHKI und TAKAMIYA (1969), VERNON et al. (1971), WESSELS et al. (1973) und KE et al. (1974) berichten über die Isolation von PS II-Partikeln, die keine PS I-Aktivitäten mehr zeigen.

Bei den drei letztgenannten Arbeiten läuft die Präparation über mehrere Schritte, die ein Wiederanstiegen des Chlorophyll a/b-Verhältnisses zur Folge haben. VERNON et al. (1971) berichten ein Verhältnis von 7,8 für die hochgereinigten PS II-Partikel (TSF-2a), der Wert wurde 1974 von KE et al. mit  $28 \pm 2$  neu bestimmt. WESSELS et al. (1973) bestimmten ein Verhältnis von 25. Keine der Präparationen führte mehr eine Hill-Reaktion aus, d.h. das wasserspaltende System war inaktiviert. Typische Reaktionen wie die Reduktion von C 550 und Oxydation

von Cytochrom  $b_{559}$  bewiesen aber den PS II-Charakter der Partikel. Ähnlich wie ARNTZEN et al. (1972) konnten KE und SHAW (1972) TSF-2a-Partikel mit TSF-Partikeln rekonstituieren. Aufgrund ihrer Ergebnisse schlugen VERNON et al. bereits 1971 ein Modell für das Photosystem II vor, das aus einem akzessorischen Komplex und einem "Reaction Centre Complex" besteht. Im Zentrum vermuten die Autoren 15 Chlorophyll a- und ein Cyt  $b_{559}$ -Molekül sowie den Akzeptor.

Zu diesem "Reaction Centre Complex" läßt sich kein analoger Pigment-Protein-Komplex finden, wie dies beim PS I der Fall war. Die bestehenden Unklarheiten dokumentieren sich deutlich in dem Übersichtsartikel von THORNER (1975), der in fünf Zeilen (s. 141) nur auf die Diskrepanz zwischen dem "Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein" mit einem Chlorophyll a/b-Verhältnis von 1 und den hohen Chlorophyll a/b-Verhältnissen der hier genannten Arbeiten hinweisen kann.

#### 2.2.4. Die Organisation und Isolation der Photosysteme bei Algen

Chloroplasten von Algen besitzen in der Regel keine unterscheidbaren Grana- und Stromabereiche wie die Chloroplasten höherer Pflanzen. Die Thylakoidmembranen können einzeln in der Matrix liegen ("unstacked membranes") oder mehrere Membranen können dicht aneinandergepreßt sein ("stacked membranes").

GRIMME und BOARDMAN (1972, 1973) isolierten eine zellfreie Chloroplastenpartikelfraktion ( $P_1$ ) aus Chlorella, die sie sukzessive mit Digitonin (1%) und Triton X-100 (1%) behandelten. Durch Differentialzentrifugation erhielten sie drei Fraktionen (DT-10; DT-30; DT-144). Die Fraktion DT-30 hatte nur noch geringe PS I-Aktivitäten, aber relativ gute PS II-

Aktivitäten, und das Chlorophyll a/b-Verhältnis betrug 1,8-2,2. Die DT-144-Partikel besaßen nur noch PS I-Aktivität und ein Chlorophyll a/b-Verhältnis von 4,3 - 5,6. Die Ergebnisse gleichen damit stark denen, die an höheren Pflanzen erhalten wurden. BROWN und GASANOV (1974) berichten ähnliche Resultate von Partikelpräparationen aus Chloroplasten der flagellaten Alge Dunaliella. Versuche an phototroph bzw. mixotroph gewachsenen Chlamydomonas-Kulturen des Wildtyps und der Mutante ac-5, mit Digitonin die Photosysteme der Chloroplasten zu isolieren, sind von dem "stacking" der Thylakoide abhängig. Ähnlich wie bei Chloroplasten höherer Pflanzen werden von Chloroplasten photoautotroph gewachsener Zellen zuerst die einzelnen "Stroma"-Thylakoide abgebaut und ergeben ein reines PS I-Partikel-Präparat. Die Chloroplasten der mixotroph gewachsenen Mutante ac-5 haben keine aneinanderliegenden Thylakoide, und die Fraktionierung nach Digitoninbehandlung ergibt keine Trennung der Photosysteme (STEINBACH und GOODENOUGH, 1975). Eine Isolation des PS II ohne Verunreinigung durch PS I berichten APEL et al. (1975) von Chloroplasten aus Acetabularia mediterranea. Diese Acetabularia-Präparation weist eine Reihe von Charakteristika auf, die von denen anderer Algen und höherer Pflanzen abweichen. Die PS I-Partikel haben keinerlei photochemische Aktivität und das Molekulargewicht des Pigment-Protein-Komplexe 1 beträgt 125 000. Die PS II-Partikel haben einen Durchmesser von 50 Å und besitzen photochemische Aktivität. Ihr Pigment-Protein-Komplex 2 hat ein Molekulargewicht von 67 000 und besteht aus zwei Untereinheiten (MG= 23 000 bzw. 21 000) im Molekül-Verhältnis 2 : 1.

Das Molekulargewicht des Pigment-Komplexes 1 beträgt bei höheren Pflanzen 110 000 und der Pigment-Protein-Komplex 2 hat bei höheren Pflanzen

und Chlamydomonas (KAN und THORNER, 1976) ein Molekulargewicht von ca. 30 000.

In ausgebleichten Zellen von Chlorella fusca sind zwei verschiedene Plastidenmembranstrukturen in elektronenmikroskopischen Bildern von "freeze-fracture"-Präparaten unterscheidbar. Bereits nach sechsstündigem Wiederergrünen sind vier Plastidenmembranstrukturen unterscheidbar (PYLOTIS et al., 1975). Ähnliche Beobachtungen hatten GOODENOUGH und STAEHELIN (1971) bei Untersuchungen an Chlamydomonas gemacht. Sie verglichen elektronenmikroskopische "freeze-etch"-Bilder von Chlamydomonas Chloroplasten aus dem Wildtyp und der Mutante ac-5. In "stacked membranes" fallen neben kleineren Partikeln 160 Å-Partikel auf, die in "unstacked membranes" fehlen, wo überwiegend kleiner Partikel bis 100 Å Durchmesser vorkommen. Von ihren Ergebnissen leiteten GOODENOUGH und STAEHELIN ein Modell ab, das in Abb. 2 wiedergegeben ist.

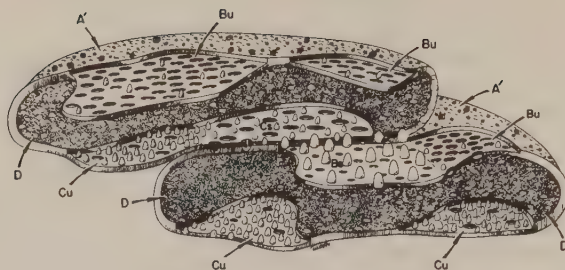


Abb. 2: Die schematische Darstellung von zwei Chloroplasten-Thylakoiden zeigt "stacked" und "unstacked" Bereiche. Wie die Gefrier-ätztechnik zeigte, sind Bu und Cu bzw. Bs und Cs die komplementären Innenflächen gespaltener Membranen. Bu und Cu wurden bei "unstacked" Membranen und Cs und Bs bei "stacked" Membranen entdeckt. Die großen Partikel in der Bs-Fläche werden anscheinend durch den "stacking" Prozess gebildet. Die Nomenklatur A' bzw. D und Form der Membranoberfläche sind von ARNTZEN et al. (1969), HOWELL und MOUDRIANAKIS (1967) und PARK und PHEIFHOFFER (1968, 1969) übernommen (aus GOODENOUGH and STAEHELIN, 1971).

Diese Vorstellung erklärt das Auftreten von vier verschiedenen Oberflächen, die in elektronenmikroskopischen Darstellungen der Chloroplasten von Algen und höheren Pflanzen immer wieder vorkommen. Dabei entsprechen den Granathylakoiden höherer Pflanzen die "stacked membranes" der Algen und den Stromathylakoiden die "unstacked membranes". In einzelnen Thylakoiden werden nur kleine Partikel ( $90-100 \text{ \AA}$ ) und kaum große Partikel ( $160-175 \text{ \AA}$ ) gefunden, hierbei ist es gleichgültig, ob dieses "unstacking" genetisch bedingt ist oder durch veränderte Ionenkonzentrationen hervorgerufen wird (IZAWA und GROOD, 1966). Die  $160 \text{ \AA}$ -Partikel werden fast nur in "stacked membranes" gefunden bzw. das "stacking" ist mit dem Auftreten großer Partikel gekoppelt. Dieses Modell ist nicht allgemein anerkannt und ARNTZEN und BRIANTAIS (1975) stellen ein Modell vor, bei dem die Partikel asymmetrisch auf den Membranhälften verteilt sind. Zur genaueren Diskussion dieses ungeklärten Problems sei auf die o.g. Zusammenfassungen von ARNTZEN und BRIANTAIS (1975) und ANDERSON (1975) verwiesen, in denen auch näher auf hier nicht erwähnte Arbeiten wie z.B. MÜHLETHALER et al. (1965, 1966, 1972), BRANTON und PARK (1967), PARK und PHEIFHOFFER (1968) eingegangen wird.

Das Auftreten von Pigment-Protein-Komplex 2 ist an das Vorkommen von "stacked membranes" und damit auch der  $160 \text{ \AA}$ -Partikel gebunden, wie Versuche mit Grana-armen Bündelscheidenzellen von  $C_4$ -Pflanzen (GENGE et al., 1974), Mutanten (ANDERSON und LEVINE, 1974 a,b) und Grana- bzw. Stroma-Thylakoid-Präparationen (THORNBERRY et al., 1967) zeigen.

Nicht immer korreliert allerdings das Vorhandensein der PS II-Aktivität mit dem Auftreten von  $160 \text{ \AA}$ -Partikeln oder "stacked membranes" wie in einigen Ergrünungsversuchen (PHENG NHU HUNG et al., 1972)

gezeigt wird. Auch bei der Scenedesmus-Mutante 2A' ist die Hill-Reaktion vor der Ausbildung typischer "stacked membranes" meßbar (SENGER et al., 1974). ANDERSON schlägt daher 1975 zwei Organisationsstufen für die Photosysteme vor, wobei die primären Photosysteme einen weniger komplexen Aufbau haben und schneller als die sekundären Photosysteme, z.B. in der Ergrünung auftreten. Das Auftreten der sekundären Photosysteme ist an die o.g. Strukturen gebunden.

### 3. Zielsetzung

Für Scenedesmus obliquus ist eine Methode ausgearbeitet worden, die mechanisch sehr stabilen Zellen der 8. Std. und der 16. Std. aufzubrechen und photosynthetisch aktive Chloroplastenpartikel zu isolieren (MELL, 1974; SENGER und MELL, 1976). Die Optimierung dieser Methode beschränkte sich bisher aber nur auf den Aufbruch der Zellen. Die Auswirkungen des pH-Wertes, des Puffers und anderer Parameter, die die photosynthetischen Reaktionen beeinflussen können, wurden nicht näher untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit sollen gezielt die Auswirkungen der oben genannten Parameter auf die Aktivität des Chloroplastenpartikelhomogenisates in Photosynthesereaktionen untersucht werden, um sowohl mit Partikeln der 8. Std., als auch der 16. Std. des Entwicklungszyklus unter optimalen Bedingungen messen zu können.

Die Zusammenfassung der vorliegenden Ergebnisse über Änderungen des Photosyntheseapparates während des Entwicklungszyklus von Algen in Teil 2.1. zeigte, daß eine Reihe von Widersprüchen aufgetreten sind. Die Ergebnisse zur PS I-Aktivität, die mit intakten Zellen gewonnen wurden, zeigen, daß sich die PS I-Aktivität bei Scenedesmus und Chlorella nicht ändert. Ergebnisse, die mit Chloroplastenpartikeln erzielt wurden, deuten dagegen auf erhebliche Aktivitätsschwankungen des PS I während des Entwicklungszyklus hin. Eine Ausnahme bilden die Messungen von FRICKEL-FAULSTICH und SENGER (1974), die mit Scenedesmus-Chloroplastenpartikeln keine wesentlichen Änderungen der PS I-Aktivität ergaben.

Mit standardisierten Meßbedingungen sollen daher im zweiten Teil der Arbeit die Chloroplastenpartikel

von Scenedesmus auf Änderungen während des Entwicklungszyklus untersucht werden, um evtl. einen Beitrag zur Klärung der bestehenden Widersprüche zu leisten. Hierzu soll auch versucht werden, das Chloroplastenpartikelhomogenisat weiter zu desintegrieren, um PS I bzw. PS II-Partikel zu isolieren bzw. anzureichern. Der Vergleich solcher Photosystem-Präparate aus Zellen der 8. Std. und der 16. Std. des Entwicklungszyklus könnte Aussagen darüber erlauben, ob bzw. wie sich die Photosysteme im engeren Sinne während der Entwicklung der Zelle verändern.

#### 4. Methodischer Teil

##### 4.1. Objekte und Anzucht

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an der einzelligen Grünalge Scenedesmus obliquus Stamm D3 (GAFFRON, 1939) durchgeführt. In einem Versuch wurde die Scenedesmus-Mutante C-6E verwendet, die freundlicherweise von Prof. N.I. BISHOP zur Verfügung gestellt wurde.

Die Anzucht erfolgte für Scenedesmus unter sterilen Bedingungen in einem Nährmedium folgender Zusammensetzung (KESSLER et al., 1957, verändert nach BISHOP und SENGGER, 1971).

|                                                            |     |                    |
|------------------------------------------------------------|-----|--------------------|
| $\text{KNO}_3$                                             | 8   | $\times 10^{-3}$ M |
| $\text{Na Cl}$                                             | 8   | $\times 10^{-3}$ M |
| $\text{Na HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$             | 1   | $\times 10^{-3}$ M |
| $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$    | 3   | $\times 10^{-3}$ M |
| $\text{Ca Cl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$              | 1   | $\times 10^{-4}$ M |
| $\text{Mg SO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$              | 1   | $\times 10^{-3}$ M |
| $\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 7,5 | $\times 10^{-6}$ M |
| $\text{Na-citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$            | 5,5 | $\times 10^{-4}$ M |

Außerdem wurden je 1 ml Spurenelementlösung A<sub>5</sub> (KRATZ und MYERS, 1955) zu 1 l der oben genannten Lösung hinzugefügt. Die Spurenelementlösung A<sub>5</sub> setzte sich wie folgt zusammen:

|                                               |                        |
|-----------------------------------------------|------------------------|
| $\text{H}_3 \text{BO}_3$                      | $4,5 \times 10^{-2}$ M |
| $\text{Mn Cl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ | $8,0 \times 10^{-3}$ M |
| $\text{Zn SO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ | $7,0 \times 10^{-4}$ M |
| $\text{Mo O}_3$                               | $1,0 \times 10^{-4}$ M |
| $\text{Cu SO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ | $3,0 \times 10^{-4}$ M |

Die Algensuspension befand sich in einer Kulturröhre von 42 cm Länge und 3,7 cm Durchmesser, die von unten mit einem Gasstrom durchlüftet werden konnte (BISHOP

und SENGGER, 1971, SENGGER et al., 1972).

Die Kulturröhrchen standen in einem Lichtthermostat der Firma Kniese, Marburg (KUHLE und LORENZEN, 1964).

Die Mutante 6E wuchs heterotroph in dem o.g. Nährmedium mit einem Zusatz von 0,5% Glucose und 0,25% gepulvertem Hefeextrakt (PRATT und BISHOP, 1968). Die Anzucht erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit je 250 ml Nährlösung in einem Dunkel-Inkubator (Typ G 25 New Brunswick Scientific Co. Inc.) bei 30°C. Für die Versuche wurden 3 Tage alte Kulturen verwendet.

Die Zellen des Wildtyps von Scenedesmus wurden aus synchron wachsenden Kulturen geerntet.

Die Synchronisation erfolgte in einem Licht-Dunkel-Wechsel von 14:10 Stunden. Jeweils zu Beginn der Lichtzeit wurde mit einer automatischen, photometrisch kontrollierten Verdünnung die Suspension auf eine konstante Zellzahl eingestellt (PFAU et al., 1971). Diese Zellzahl war für Scenedesmus  $3,12 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Temperatur betrug 27°C. Die Kultur wurde ständig mit einem Gemisch von 3% CO<sub>2</sub> in Luft (ca. 5l/Std.) durchperlt. Die Lichtintensität durch eine Kombination von je 4 Leuchtstoffröhren des Typs Osram-L 40 W/15-1 (Tageslicht) und Osram-L 40 W/25-1 (Universal weiß) betrug an der Oberfläche der Kulturröhrchen 15 000 Lux zur Lichtzeit.

Die so erzielte Synchronisation entsprach dem von SENGGER und BISHOP (1969) geforderten Standard.

Um ausreichend Material für die Versuche zu erhalten, wurden gegen Ende des vorhergehenden Zellzyklus mehrere Kulturröhrchen mit synchron wachsenden Zellen aus der automatisch kontrollierten Kultur, in der entsprechenden Zellzahl, angeimpft.

#### 4.2. Die Bestimmung von Versuchsparametern

- a) Die relative Zellzahl (abk.: rZZ) der Kultur wurde mit einer Zählkammer (Thoma neu) bestimmt. Um die absolute Zellzahl pro ml Algensuspension zu erhalten, muß mit dem Faktor  $1,56 \times 10^4$  multipliziert werden.  
Der Erfolg beim Aufbruch der Zellen wurde mikroskopisch im Interferenz-Phasen-Kontrast-Verfahren kontrolliert (vergl. MELL, 1974).
- b) Das Volumen dichtest zusammenzentrifugierter Zellen, nach der englischen Literatur mit PCV (packed cell volume abgekürzt) wurde in Hämatocritröhrchen bestimmt. Hierzu wird ein bestimmtes Volumen einer gut durchmischten Algensuspension in den Hämatocritröhrchen fünf Minuten lang bei  $1400 \times g$  in einer Tischzentrifuge (Heraeus Christ GmbH, Osterode; Typ Labofuge II) abzentrifugiert.
- c) Die Pigmente der Algenzellen wurden in drei Schritten mit siedendem Methanol extrahiert. Um dabei eine Umwandlung des Chlorophylls in Phaeophytin zu vermeiden, wurde dem Methanol etwas Magnesiumhydroxidcarbonat zur Pufferung zugesetzt. Die Konzentration der Chlorophylle wurde direkt in Methanol gemessen und nach der von HOLDEN (1965), unter Benutzung der spezifischen Absorptionskoeffizienten von MAC KINNEY (1941), aufgestellten Gleichung berechnet.

$$\begin{aligned}\text{Gesamtchloroph. (mg/l)} &= 25,5 \times D_{650} + 4,0 \times D_{665} \\ \text{Chlorophyll a (mg/l)} &= 16,5 \times D_{665} - 8,3 \times D_{650} \\ \text{Chlorophyll b (mg/l)} &= 33,8 \times D_{650} - 12,5 \times D_{665}\end{aligned}$$

Hierbei bedeuten  $D_{650}$  und  $D_{665}$  die Absorption bei 650 nm bzw. 665 nm.

Die Messungen wurden in einem Einstrahl-Spektral-photometer (Zeiss, Oberkochen; Typ PM Q III) durchgeführt.

#### 4.3. Chromatographische Trennung, Identifikation und quantitative Analyse der Pigment-Zusammensetzung

Die Chlorophylle und Carotinoide wurden aus Zellen und Chloroplastenpartikel-Gemischen durch mehrfaches Aufkochen mit Methanol extrahiert. Bei digitonin-haltigen Fraktionen aus den Dichtegradienten mußte mit einem Petroleumbenzin/Aceton-Gemisch 2-3-mal ausgeschüttelt und die verunreinigten Petroleumbenzin-Phasen mit Wasser mehrfach gewaschen werden.

Die Methanol- bzw. Petroleumbenzin/Aceton-Extrakte wurden unter ca. 20 torr in einem Rotationsverdampfer eingedampft und die Pigmente in Aceton aufgenommen. Die Auftragung der Acetonlösung auf die Chromatographie-Dünnschichtplatte erfolgte strichförmig mit einer Pipette per Hand.

Die fast ausschließlich angewandte Trennung der Pigmente in Gruppen ähnlicher Polarität erfolgte mit einem Verteilungschromatographiesystem nach HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966) modifiziert nach METZNER et al. (1965).

Die Schichtzusammensetzung ausreichend für 5 Platten (20 cm x 20 cm):

|       |                                           |
|-------|-------------------------------------------|
| 20 g  | Kieselgel G <sub>1</sub> (Merck-Nr. 7731) |
| 12 mg | Ca(OH) <sub>2</sub>                       |
| 44 ml | 5 x 10 <sup>-3</sup> M Ascorbinsäure      |

Laufmittel:

|         |                                        |
|---------|----------------------------------------|
| 100 ml  | Petroleumbenzin (Siedebereich 40-60°C) |
| 10 ml   | Isopropanol                            |
| 0,25 ml | Wasser                                 |

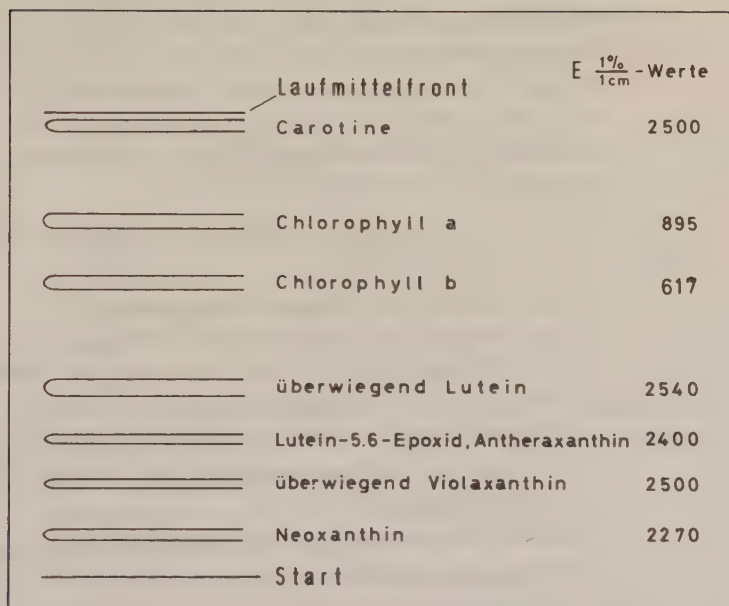


Abb. 3: Verteilung der Pigmente in der Verteilungs-  
chromatographie nach HAGER und MAYER-  
BERTENRATH (1966). Die E 1 %/1 cm-Werte  
gelten für absoluten Äthanol. Sie sind für  
die Chlorophylle von den E 1 %/1 cm-Werten  
in 80 %igem Aceton von McKINNEY (1940) für  
Äthanol neu bestimmt worden. Weitere Einzel-  
heiten befinden sich im Text.

Die in diesem System aufgetrennten Banden (vgl. Abb. 3) wurden ausgekratzt, die Pigmente mit 100% Äthanol ausgewaschen und die Spektren aufgenommen. Die bisher beschriebenen Schritte wurden alle bei grünem Sicherheitslicht, einer Temperatur von 20°C und, soweit wie möglich, unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um Isomerisation und Oxidation zu vermeiden.

Die Identifizierung der Carotinoide basiert auf folgenden Parametern:

- a) der Lage im Verteilungsschromatogramm;  
hier werden die Carotinoide in Gruppen ähnlicher Polarität aufgetrennt, und die Lage der Banden läßt grobe Informationen bezüglich der Zahl der sauerstoffhaltigen Gruppen im Molekül zu;
- b) die Form des Absorptionsspektrums (HAGER und MEYER-BERTENRATH, 1967 a); sie ermöglicht Vorstellungen von der chromophoren Gruppe des Carotinoid-Moleküls;
- c) die Lage der Absorptionsmaxima im jeweiligen Lösungsmittel (DAVIES, 1967; HAGER und MEYER-BERTENRATH, 1967 b);
- d) der Verschiebung des Spektrums durch Säurekatalyse (HAGER und STRANSKY, 1970 a); 5,6-Epoxide erfahren eine säurekatalysierte Umlagerung in ihre furanoide Form, die 5,8-Epoxide. Pro Umlagerung verschiebt sich das Spektrum um ca. 20 nm in den kurzwelligen Bereich;
- e) der Fluoreszenz im UV-Licht (bereits auf der Chromatographieplatte); ungefärbte Carotine, Phytoen und Phytofluoren fluoreszieren.

Die quantitative Bestimmung der isolierten Spektren ist ebenfalls aus dem Absorptionsspektrum möglich. Unter Zugrundelegung der Formel von HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966) und bekannter  $E$  1%/1cm-

Werte (DAVIES, 1976; HAGER und MEYER-BERTENRATH, 1966; JEFFREY, 1968) lassen sich die Gewichtsmengen aus der Extinktion im Hauptmaximum bestimmen.

#### 4.4. Die Bedingungen der Chloroplastenpartikelpräparation

Die Chloroplastenpartikelpräparation wurde nach der von MELL (1974) bzw. MELL und SENGGER (1976) beschriebenen Methode mit Glasperlen in Stahlbechern in der Vibrogen-Zellmühle Typ Vi 2 (Edmund Bühler, Tübingen) durchgeführt. Der Stahlbecher wird von einem fließenden Wassermantel gekühlt und mit einer Frequenz von 75 Hertz und einer Amplitude von 7 mm geschüttelt.

##### Durchführung:

Nach dem Abzentrifugieren der Algen in einer Laborzentrifuge (Heraeus Christ GmbH, Osterode; Typ Universal Junior III), fünf Minuten lang bei 1400 x g, einmaligem Waschen in der Aufbruchslösung und erneutem Abzentrifugieren wurden die Algen in soviel Aufbruchslösung suspendiert, daß eine Konzentration von 1 ml PCV/20 ml Aufbruchslösung entstand.

Diese Suspension wurde für den Aufbruch der Zellen mit gewaschenen Glasperlen (0,7 mm Ø) gemischt und so in einen Stahlbecher gefüllt, daß die Mischung bis 2 mm unter den Rand des Stahlbeckers stand und die Glasperlen mit dem Flüssigkeitsspiegel gleich hoch abschlossen (vergl. Abb. 4)

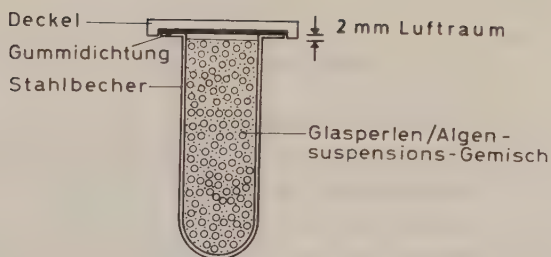


Abb. 4: Schematischer Querschnitt eines mit dem Glasperlen/Algensuspensions-Gemisch gefüllten Stahlbechers.

Je nach benötigter Menge wurden Stahlbecher mit 18,5 ml, 52 ml oder 108 ml Fassungsvermögen verwendet.

Die Vibrogen-Zellmühle befand sich in einem Kälte-labor (+ 4°C), und der Stahlbecher mit dem Glas-perlen/Algensuspensions-Gemisch wurde mit Eiswasser im Durchfluß 5 min vorgekühlt.

Die Aufbruchdauer betrug immer 5 Minuten. Selbst bei einer Homogenisationsdauer von 10 Minuten steigen die Temperaturen in der Glasperlen/Algen-suspension nicht überdurchschnittlich, 1,5°C, maximal 2,9°C, an. Nach dem Mahlvorgang wurde das Homogenat über eine Fritte (Schott & Gen., Typ 17 D 1) von den Glasperlen abgetrennt. Mit dem Volumen der eingesetzten Algensuspension wurden die Glasperlen in zwei Schritten ausgewaschen.

Das gefilterte Homogenat wurde durch Differential-zentrifugation ( $570 \times g$ ; 5 min) von den ganzen Zellen befreit und als Chloroplastenpartikelhomogenat in den Versuch eingesetzt.

#### Die Zusammensetzung der Aufbruchslösung

Die Zusammensetzung der Aufbruchslösung wie sie BERZBORN und BISHOP (1973) wählten, wurde nach SELMANN und BANNISTER (1971) sowie GARNIER und MAROC (1971) modifiziert:

$10^{-2}$  M Na Cl  
 $10^{-2}$  M K Cl  
 $2,5 \times 10^{-3}$  M Mg Cl<sub>2</sub>  
 $10^{-5}$  M EDTA  
 $2 \times 10^{-2}$  M Tricin /KOH-Puffer

Z.T. wurde der Tricin -Puffer durch einen Phosphat-Puffer nach Sörensen (Medium II) ersetzt (pH-Werte werden im Text jeweils angegeben).

Zusammensetzung der Waschlösung bei Verwendung des Tricin -Puffers:

$10^{-2}$  M Na Cl  
 $10^{-2}$  M K Cl  
 $2,5 \times 10^{-3}$  M Mg Cl<sub>2</sub>  
 $10^{-5}$  M EDTA  
 $2 \times 10^{-2}$  Tricin /KOH-Puffer pH 7,5  
0,56 M Rohrzucker

Die Konzentration an Na Cl, K Cl, Mg Cl<sub>2</sub>, EDTA und des Puffers bleiben also gleich. Die Konzentration an Rohrzucker war nach dem Auswaschen 0,34 M ( Medium I).

Bei Verwendung des Phosphatpuffers ist der Waschlösung keine Saccharose zugesetzt worden, d.h. sie hatte die gleiche Zusammensetzung wie die Aufbruchslösung (Medium II).

#### 4.5 Herstellung und Trennung von Chloroplasten-Subpartikeln

Zur Herstellung von Subpartikeln wurde das nach 4.4 gewonnene Chloroplastenpartikelhomogenat mit einer 2%igen Digitoninlösung im Volumenverhältnis von 1:1 gemischt, so daß eine 1%ige Digitoninendkonzentration erreicht wurde.

Das Digitonin ist für alle Subpartikelpräparationen unter Erwärmen im Medium II gelöst worden. Die digitoninhaltige Suspension wurde im Dunkeln bei 4°C eine Stunde mit einem Magnetrührer vorsichtig gerührt und dann auf einen Saccharose-Dichtegradienten gegeben.

Für die vergleichende Untersuchung der Wirkung von Triton X-100 wurde die benötigte Menge für eine 1%ige Endkonzentration von Triton x-100 abgewogen und zu dem Chloroplastenpartikelhomogenat gegeben. Nach einer Einwirkungsdauer von einer Stunde im Dunkeln bei 4°C unter Rühren wurde die Suspension auf den Saccharose-Dichtegradienten gegeben.

Zur Erprobung der Wirkung von Ultraschall wurde mit einem Branson Sonifier, Typ S 125 3 x 30 sec mit Pausen von je einer Minute beschallt. Zur Kühlung befand sich das Gefäß vor und während der Beschallung in einem Eisbad.

##### Herstellung und Wahl der Dichtegradienten:

Das benötigte Endvolumen an Subpartikeln bestimmte die Wahl der Methode:

- a) in der Regel wurden die Dichtegradienten in 2,54 cm x 8,98 cm Polycarbonat-Röhrchen aufgebaut:

Die kontinuierliche Abnahme der Saccharosekonzentration kam durch einen einfachen, selbstgebaute Plexiglas-Gradientenmischer zustande, und die Zuckerlösung wurde über einen Glasrechen

und eine Vielfach-Schlauchpumpe (Desaga, Heidelberg, Typ STA-V Vielfach-Schlauchpumpe 13 1900) gleichmäßig und überschichtend auf 6 Zentrifugengläser verteilt. Auf die 30 ml-Gradienten ("kleine- Gradienten") wurden je 7 ml Suspension gegeben.

- b) Bei Bedarf von größeren Chloroplasten-Subpartikelmengen ist ein Zonalrotor der Firma Beckman, Typ J CF -2 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California) mit 1,9 l Fassungsvermögen verwendet worden. In diesem Fall betrug das Gradientenvolumen 1,6 l, und es wurden 150-200 ml Suspension eingesetzt und mit Medium II bis zur Füllung des Rotors überschichtet (Zonal-Dichtegradient).

Die Zonal-Dichtegradienten sind mit einer speziellen Gradientenpumpe (Gradient Pump Model 141, Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California) aufgebaut worden, die auch zum Auspumpen des Gradienten in einen 2,5 l Standzylinder benutzt wurde.

Die "kleinen Gradienten" wurden mit einem Ausschwingrotor in einer Ultrazentrifuge (Rotor Type SW 27, Ultrazentrifuge Typ L 2-65 B, Beckman Instr., Inc., Palo Alto, California) bei 113 000 x g 14 Stunden zentrifugiert, die "Zonaldichtegradienten" in einer Kühlzentrifuge (Typ 21-B, Beckman Instr., Inc., Palo Alto California) bei 35 000 x g (= größtmögliche Zentrifugalbeschleunigung des Systems) für 40 Stunden.

Die durch die geringere Zentrifugalbeschleunigung notwendige Verlängerung des Laufes beim Zonaldichtegradienten hatte keinen Einfluß auf die Präparation.

Die Auftrennung der Subpartikel in beiden angewendeten Gradienten war identisch, und die Fraktionen wurden mit Hilfe einer Pipette mit angeschlossener Schlauchpumpe selektiv isoliert.

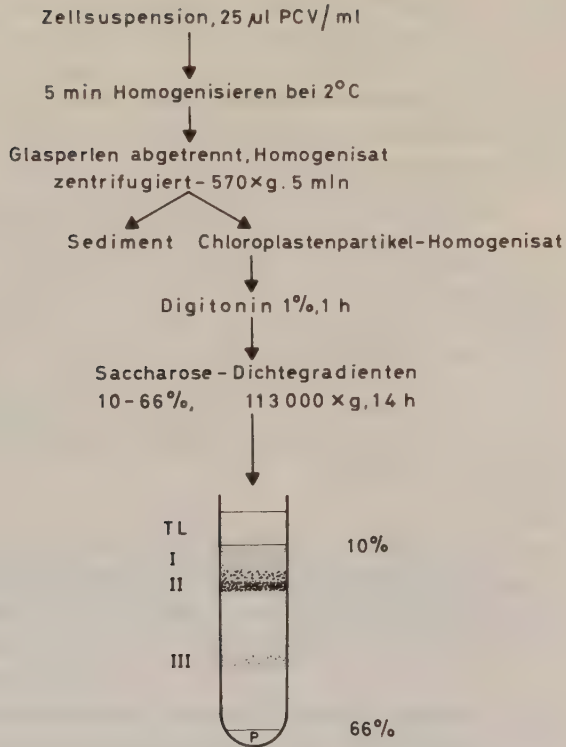


Abb. 5: Schematische Darstellung des Präparations-  
verlaufes zur Herstellung und Trennung von  
Chloroplasten-Subpartikeln aus Zellen von  
Scenedesmus obliquus.

Der gesamte Trennungsgang ist schematisch in Abb. 5 zusammengefaßt.

#### 4.6. Die polarographische Messung des Sauerstoffumsatzes bedingt durch Photosynthesereaktionen

Die Sauerstoffentwicklung der Photosynthese, der Hill-Reaktion sowie die Sauerstoffaufnahme durch die Photosystem I-Reaktion und die Atmung wurden polarographisch in einem schreibenden "Gilson Oxygraph" (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin, Techmation Düsseldorf) (FORK, 1972) mit einer stationären Mikro-Clark-Elektrode verfolgt. Die Polarisationsspannung betrug  $-0,8$  V. Der Polarisationsstrom ist der Sauerstoffkonzentration im Temperaturbereich von  $20^{\circ}\text{C}$  -  $35^{\circ}\text{C}$  proportional. Konzentrationsänderungen wurden zeitabhängig bei einem Papiervorschub von  $1$  mm/sec registriert. Der numerische Wert des Tangens der so geschriebenen Kurve ist der Änderung der Sauerstoffkonzentration direkt proportional.

Um Aussagen über die absoluten Sauerstoffmengen machen zu können, ist das System vor jeder Messung geeicht worden:

Bezugspunkte waren luftgesättigtes Wasser (bei  $28^{\circ}\text{C}$   $245 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ ; ESTABROOK (1967) und der "Nullstrom" des Gerätes, der einer sauerstofffreien Lösung entspricht.

Die Meßkammer mit  $1,8$  ml Inhalt wurde durch einen Wassermantel temperaturkonstant gehalten. Ein Mikromagnetrührer hielt die Algen- bzw. Chloroplasten-Partikelsuspensionen in Bewegung und verhinderte so eine Sedimentation. Die Belichtung erfolgte seitlich mit einem Projektor (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar; Typ Prado Universal), dessen  $90$  mm Optik mit Zwischenringen dem Versuchsaufbau angepaßt wurde. Mit einem Cut-off-

Filter aus rotem Plexiglas wurden alle Wellenlängen unter 620 nm abgeschnitten. Die maximale Lichtintensität betrug so  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec.}$

#### 4.6.1. Messung der Photosynthese

Zur Messung der photosynthetischen Sauerstoffrate wurden die Zellen des jeweiligen Entwicklungsstadiums abzentrifugiert und in soviel Warburg-Puffer Nr. 9 bzw. im Medium II aufgenommen, daß eine Konzentration von 10  $\mu\text{l}$  PCV/ml Puffer entsteht (SENGER, 1970 a).

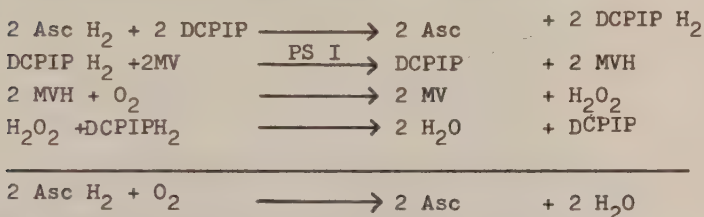
#### 4.6.2. Messung der Hill-Reaktion

Bei Zellen wurde wie unter 4.6.1. in Medium II aufgenommen und 1,8 ml Algensuspension in die Meßkammer gegeben. Der Photosynthese-Messung folgte die Zugabe von 0,5 ml p-Benzochinon und nach 5 Minuten Inkubation die Messung der Hill-Reaktion. Bei Messung mit Chloroplastenpartikelhomogenaten oder Subpartikeln wurden die gleichen Volumina eingesetzt. Als weiteres Hill-Reagenz wurde Kaliumhexacyanoferrat (III) verwendet.

#### 4.6.3. Messung der PS I-Aktivität

Die PS I-Aktivität wird mit dem artifiziellen System Ascorbat ( $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ )/DCPIP ( $10^{-4} \text{ M}$ ) als Elektronendonator und Methylviologen ( $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) als Elektronenakzeptor erfaßt; PS II-Einflüsse werden durch DCMU-Zugabe ( $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) gehemmt.

Die einzelnen Reaktionen können wie folgt formuliert werden (nach STROTMANN und v.GÜSSELN, 1972):

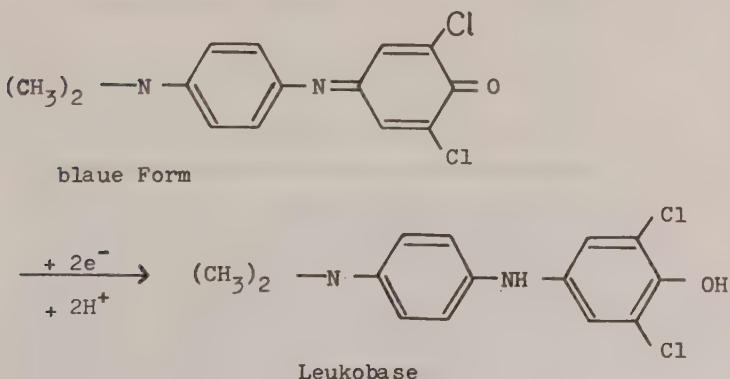


DCPIP und MV wirken also nur im katalytischen Sinne.

Vergleichend ist anstelle von DCPIP auch DAD ( $10^{-4}$  M) eingesetzt worden.

#### 4.7. Die Messung der Hill-Reaktion als Entfärbung von DCPIP

Das 2,6-Dichlorphenolindophenol(DCPIP) ist im oxydierten Zustand blau und im reduzierten Zustand farblos, da die beiden Benzolringe nach der Reduktion kein zusammenhängendes System konjugierter Doppelbindungen mehr bilden.



Bei Belichtung der Chloroplastenpartikelsuspension wird das blaue DCPIP in der Hill-Reaktion reduziert, und die Entfärbung kann in einem Spektralphotometer verfolgt werden.

Die Messung erfolgte in einem Zweistrahlspektralphotometer (Aminco DW-2UV, das für seitliche Belichtung der Probe umgebaut war. Durch eine optische Schere konnte die Probe simultan belichtet und die Extinktionsänderung gemessen werden. Das Anregungslicht kam von einem Projektor (PRADO universal), in dessen Strahlengang ein 657 nm Interferenzfilter (Schott & Gen., Mainz) eingeschoben war. Die Extinktionsabnahme wurde bei 578 nm kontinuierlich registriert, während eine Filterkombination (Schott & Gen., Mainz; Typ IL 578 und ein Blauglasfilter 400-590 nm (Corning Glas Nr. G.S. 4.96,9950061) den Photomultiplier vor dem Anregungslicht schützte.

Der Auswertung wurde ein millimolarer Extinktionskoeffizient von  $\epsilon = 6,25 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  zugrunde gelegt, der für den angewandten pH-Bereich und die Meßwellenlänge bestimmt worden war.

Proben- und Referenzküvette enthielten den gleichen Ansatz an Chloroplastenpartikelhomogenat bzw. Chloroplastensubpartikeln (Chlorophyllkonzentration  $15 \mu\text{g/ml}$ ) und  $4 \times 10^{-5} \text{ M}$  DCPIP), so daß der Meßwert der Aktivitätsdifferenz zwischen belichteter und unbelichteter Probe entspricht.

Bei den Chloroplastenpartikeln wurde zusätzlich noch die DPC-abhängige DCPIP-Reduktion nach VERNON und SHAW (1969) gemessen. Hierzu wurde zuerst DPC zur Probe und zur Referenz gegeben ( $10^{-3} \text{ M}$  Endkonzentration) und die Reduktion bei Belichtung gemessen. Anschließend ist die PS II-abhängige Reduktion durch DCMU ( $6,25 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) gehemmt worden, um den PS I-Anteil in der Reaktion

zu ermitteln. Die Differenz der beiden Extinktionsänderungen ( $\Delta E_{\text{DPC}} - \Delta E_{\text{DPC+DCMU}}$ ) entspricht dem PS II-Anteil der Reaktion.

#### 4.8. Bestimmung des Chl/ $P_{700}$ -Verhältnisses im Chloroplastenpartikelhomogenat

An Chloroplastenpartikelhomogenaten wurden nach MARSHO und KOK (1971) chemisch induzierte Absorptionsdifferenzen bei einer Wellenlänge von 700 nm gemessen. Das Reaktionszentrum von PS I, genannt  $P_{700}$  wird durch Kalimhexacyanoferrat (III) ( $10^{-3}$  M) oxydiert und durch reduziertes Ascorbat ( $5 \times 10^{-3}$  M) reduziert.

Die Messung erfolgte in einem Aminco-Chance DW 2 und einem Shimadzu UV 300 Spektralphotometer im "split-beam"-Verfahren. Nach der Zugabe von Ascorbat bzw. Kaliumhexacyanoferrat (III) wurde das Differenzspektrum aufgezeichnet und die Extinktionsänderung bei 700 nm gegen den unveränderten 750 nm-Wert ausgemessen.

Für die Bestimmungen der Konzentration an  $P_{700}$  ist der Extinktionskoeffizient von  $\epsilon = 64 \text{ cm}^2 \times \text{mM}^{-1}$  nach HIMAYA und KE (1972) verwendet worden.

#### 4.9. Fluoreszenz-Anregungs-Messungen

Vergleiche von Absorptionsspektren und Anregungsspektren der Fluoreszenzemission chlorophyllhaltiger Proben erlauben Aussagen zur Energieübertragung zwischen den in der Probe enthaltenen Pigmenten. Das Prinzip der Messung beruht auf der Eigenschaft der Chlorophylle, aus einem angeregten Zustand unter Emission eines Lichtquants (= Fluoreszenz) in den Grundzustand zurückkehren zu können. Diese Fluoreszenz ist unabhängig davon, ob das Chlorophyllmolekül den angeregten Zustand durch Eigen-

absorption von Lichtenergie erreicht oder ob es Energie von benachbarten Molekülen übernommen hat. Die Intensitätsmaxima der Fluoreszenzemission sind vom Zustand der Proben, z.B. in vitro oder in vivo, der Proteinbindung und der Temperatur abhängig (BOARDMAN et al., 1966).

Die absoluten (quantengleichen) Fluoreszenz-Anregungsspektren wurden mit einem korrigierten Spektralfluorometer der Firma Shimadzu (Typ RF - 502) aufgenommen. Die Besonderheit dieses Gerätes ist die Korrektur auf quantengleiche Einstrahlung bei jeder Anregungs-Wellenlänge im Bereich von 240 nm - 600 nm. Durch einen Strahlenteiler wird ein Teil des Anregungslichtes auf eine Rhodamin B-Lösung gelenkt und die Rhodamin B-Fluoreszenz durch einen zweiten Photomultiplier gemessen. Die Rhodamin B-Fluoreszenz ist in dem angegebenen Bereich ein Ein-Quanten-Prozess und wird vom Gerät mit der Fluoreszenz der Probe verrechnet. Neben Fluoreszenzmessung bei Zimmertemperatur in der kommerziellen Meßkammer wurden auch Tieftemperatur-Messungen bei 77°K mit einer Eigenbau-Tieftemperatur-Vorrichtung aufgenommen. In die Position des normalen Küvettenhalters wurde ein Dewar-Gefäß gestellt, das im Winkel von 90° zwei Fenster hatte. In dem Dewar-Gefäß stand eine 2 mm Plexiglassküvette in einem Winkel von 45° zu jedem der beiden Fenster des Gefäßes. Durch ein Fenster des Dewar-Gefäßes wurde das Anregungslicht eingestrahlt, und durch das zweite Fenster wurde die Fluoreszenz gemessen.

#### 4.10. Die Messung von Absorptionsspektren bei Zimmer- und Tieftemperatur (77°K)

Zimmertemperatur-Absorptionsspektren wurden vergleichend in zwei Zweistrahlsspektralphotometern

der Firma Shimadzu (Typ MPS 50 L bzw. MPS 5000) und einem Gerät der Firma Aminco (DW2-UV-VIS) aufgenommen. Für die Messungen sind 3 ml und 1 ml Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet worden.

Die Tieftemperaturspektren wurden bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff ( $77^{\circ}\text{K}$ ) in einem Zweistrahl-spektralphotometer (Shimadzu MPS 50 L) von 400 nm bis 750 nm mit der zugehörigen Tieftemperaturvorrichtung aufgenommen. Alle Proben waren im Medium II suspendiert. Die entsprechenden Lösungen befanden sich in der Referenzküvette. Die Küvetten-dicke betrug, abhängig von der Konzentration der Probe 1 mm oder 2 mm.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1. Bestimmung der Eigenschaften der Chloroplastenpartikel <sup>1)</sup>

Synchronkulturen von Scenedesmus obliquus zeigen während des Entwicklungszyklus Schwankungen der Photosynthesekapazität mit einem Maximum zur 8. und einem Minimum zur 16. Stunde nach Lichtbeginn. Es ist zu erwarten, daß sich während des Entwicklungszyklus als Folge oder Ursache der Photosynthesekapazitätsschwankungen auch die Eigenschaften der Chloroplastenpartikel verändern. Um sicher zu sein, daß bei vergleichenden Messungen über den Entwicklungszyklus reale Aktivitätsänderungen und keine Artefakte gemessen werden, ist es notwendig, die Eigenschaften der Chloroplastenpartikel aus verschiedenen Entwicklungsstadien unter den verschiedensten Meßbedingungen zu bestimmen. Für Scenedesmus scheint es sinnvoll, die Versuche mit Chloroplastenpartikeln ebenfalls zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus durchzuführen, da physiologische Veränderungen zu den beiden Extrempunkten der Aktivitätsschwankungen am stärksten hervortreten müßten.

#### 5.1.1. Die Abhängigkeit der photosynthetischen Teilreaktionen vom pH-Wert

Die Bestimmung der Abhängigkeit der photosynthetischen Teilreaktionen vom pH-Wert wurde im Be-

---

1) Die bisherige Bezeichnung "Chloroplastenpartikelhomogenat" wird durch den einfacheren Begriff "Chloroplastenpartikel" ersetzt.

reich von pH 6,0 bis pH 9,0 in Schritten von 0,5 pH durchgeführt. Von pH 6,0 bis pH 8,0 wurde Medium II als Pufferkomponente, also ein Phosphatpuffer, und übergreifend, von pH 7,0 bis pH 9,0 Medium I als Pufferkomponente, also ein Tricine/KOH-Puffer (N-tris (hydroxymethyl) methylglycine/KOH), gewählt. Tricine/KOH ist ein zwitterionischer Puffer, der immer häufiger bei der Arbeit mit Chloroplastenthylakoiden erfolgreich eingesetzt wird, und der auch von BERZBORN und BISHOP (1973) bei der Arbeit an Scenedesmus-Chloroplastenpartikeln benutzt wurde. Eine ausführliche Beschreibung der Puffer wurde von GOOD und IZAWA (1971) gegeben, die besonders die Wirkung der Puffer auf Photosynthesereaktionen untersuchten.

#### 5.1.1.1. Die Abhängigkeit der PS II-Aktivität vom pH-Wert

Die Aktivität von PS II in den Chloroplastenpartikeln wurde in drei Versuchsserien als Hill-Reaktionen mit drei verschiedenen Hill-Reagenzien gemessen. p-Benzochinon (pBQ) ist das einzige Hill-Reagenz, das bisher an intakten Zellen synchronisierter Scenedesmus-Kulturen erfolgreich eingesetzt wurde und mit Sicherheit nur vor PS I abgreift (vgl. SENGGER, 1970 b). Kaliumhexacyanoferrat (III) ist das klassische Hill-Reagenz und wurde bisher in einer Vielzahl von Experimenten mit Chloroplastenpartikeln eingesetzt. Die Sauerstoffentwicklung der Hill-Reaktion mit pBQ und Kaliumhexacyanoferrat wurde polarographisch gemessen.

Das Hill-Reagenz 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) wird durch Reduktion farblos und bietet die Möglichkeit, die Reaktion in einem Spektral-

photometer zu messen. Diese Methode bietet sich besonders dann an, wenn eine Sauerstoffmessung nicht möglich ist, weil das wasserspaltende System beschädigt wurde und künstliche Elektronendonoren eingesetzt werden müssen.

Abbildung 6 zeigt die Hill-Reaktion mit pBQ in Medium II. In beiden Entwicklungsstadien (8. und 16. Stunde) steigt die Aktivität der Chloroplastenpartikel mit steigendem pH-Wert gleichmäßig an, um bei pH 7,5 ein Maximum zu erreichen. Eine schwache Abnahme der Sauerstoffentwicklung bei pH 8,0 ist nur zur 8. Stunde eingetreten. Im Medium I (Abb. 7) hat die Reaktion der Chloroplastenpartikel zur 16. Stunde ebenfalls ein breites Maximum von pH 7,5 bis 8,0 und fällt dann langsam bis pH 9,0 ab. Die Chloroplastenpartikel der 8. Stunde zeigen noch einen leichten Anstieg der Hill-Reaktion von pH 7,5 bis 8,0, um dann sehr stark bei pH 8,5 und pH 9,0 abzufallen. Bei pH 9,0 ist die Aktivität zur 16. Stunde des Entwicklungszyklus höher als zur 8. Stunde. Die Hill-Reaktionen im Medium II mit Kaliumhexacyanoferrat (III) als Elektronenakzeptor steigen vergleichbar der Hill-Reaktionen mit pBQ bis pH 7,5 an, fallen dann aber bei pH 8,5 stärker ab (Abb. 8). Die pH-Abhängigkeit der Hill-Reaktion im Medium I ist zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus von der zur 16. Stunde verschieden (Abb. 9). Zur 16. Stunde reicht das breite Aktivitätsmaximum von pH 7,0 bis pH 8,0, während zur 8. Stunde das Maximum bei pH 8,0 liegt und die Aktivität unterhalb pH 8,0 schwach sinkt und bei pH 7,0 schließlich ebenso groß ist wie zur 16. Stunde. Oberhalb von pH 8,0 fällt die Aktivität bei beiden Entwicklungsstadien stark ab.

Die Abhängigkeit der Entfärbung von DCPIP vom pH-Wert ist nur mit der Puffer-Reihe von Medium II

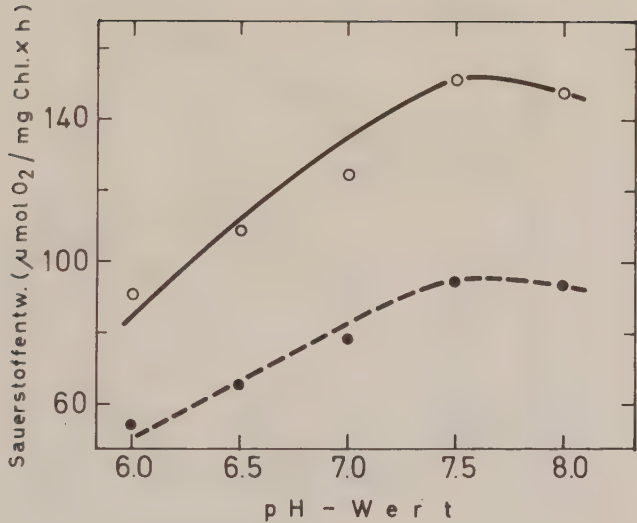


Abb. 6: Die Abhängigkeit der Hill-Reaktion mit pBQ vom pH-Wert im Medium II. Die Sauerstoffentwicklung der Reaktion mit Chloroplastenpartikeln von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Das Anregungslicht hatte eine Wellenlänge von  $> 620 \text{ nm}$  und eine Intensität von  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Chlorophyllkonzentration  $15 \mu\text{g/ml}$ , pBQ  $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  
o — o = 8. Stunde, • ---- • = 16. Stunde

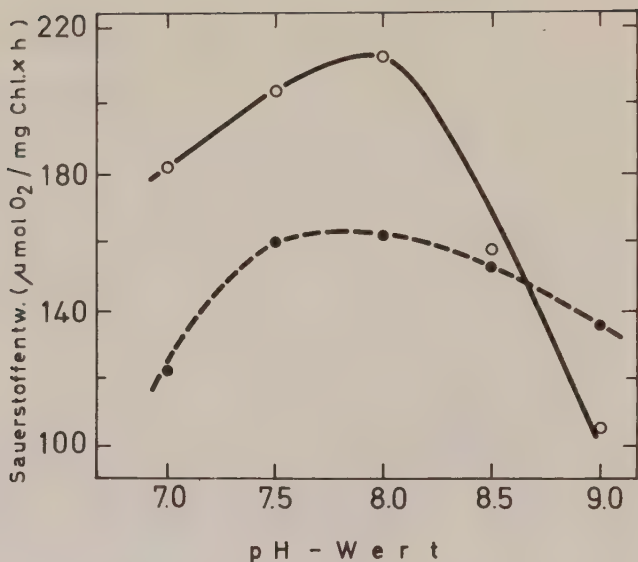


Abb. 7: Die Abhängigkeit der Hill-Reaktion mit pBQ vom pH-Wert im Medium I. Die Sauerstoffentwicklung der Reaktion mit Chloroplastenpartikeln von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Das Anregungslicht hatte eine Wellenlänge von  $> 620 \text{ nm}$  und eine Intensität von  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Chlorophyllkonzentration  $15 \mu\text{g/ml}$ , pBQ  $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  
 o — o = 8. Stunde, • ---- • = 16. Stunde

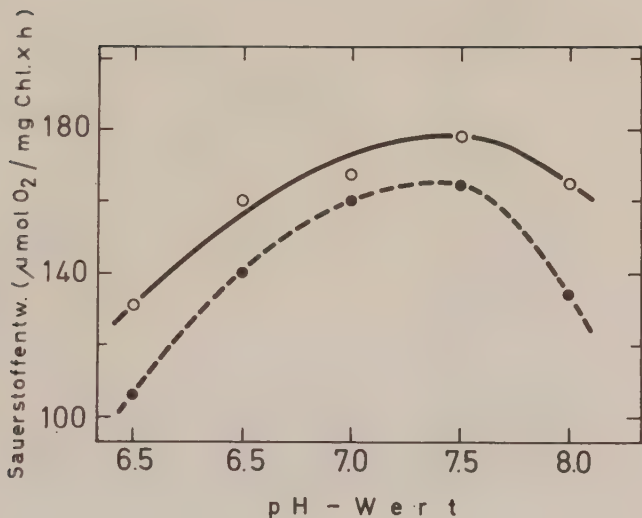


Abb. 8: Die Abhängigkeit der Hill-Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat (III) vom pH-Wert im Medium II. Die Sauerstoffentwicklung der Reaktion mit Chloroplastenpartikeln von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Das Anregungslicht hatte eine Wellenlänge von  $>620 \text{ nm}$  und eine Intensität von  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Chloroplastenkonzentration  $15 \mu\text{g/ml}$ , Kaliumhexacyanoferrat (III)  $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  
 o ——— o = 8. Stunde, ● ---- ● = 16. Stunde

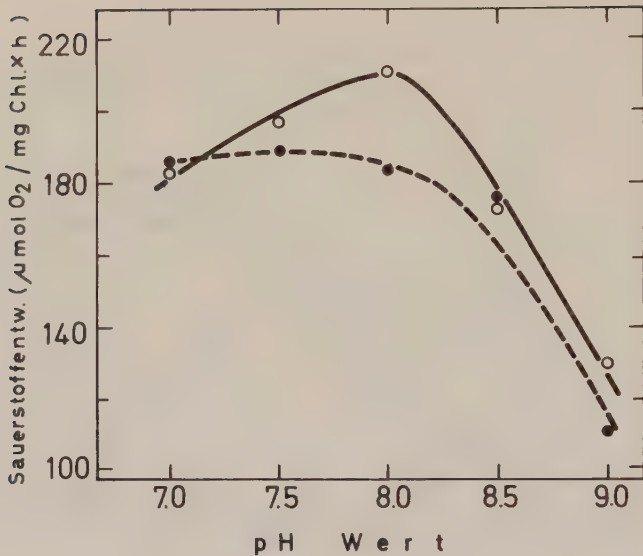


Abb. 9: Die Abhängigkeit der Hill-Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat (III) vom pH-Wert im Medium I. Die Sauerstoffentwicklung der Reaktion mit Chloroplastenpartikeln von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Das Anregungslicht hatte eine Wellenlänge von  $> 620 \text{ nm}$  und eine Intensität von  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Chloroplastenkonzentration  $15 \mu\text{g/ml}$ , Kaliumhexacyanoferrat (III)  $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  
□ — o = 8. Stunde, ● ---- ● = 16. Stunde

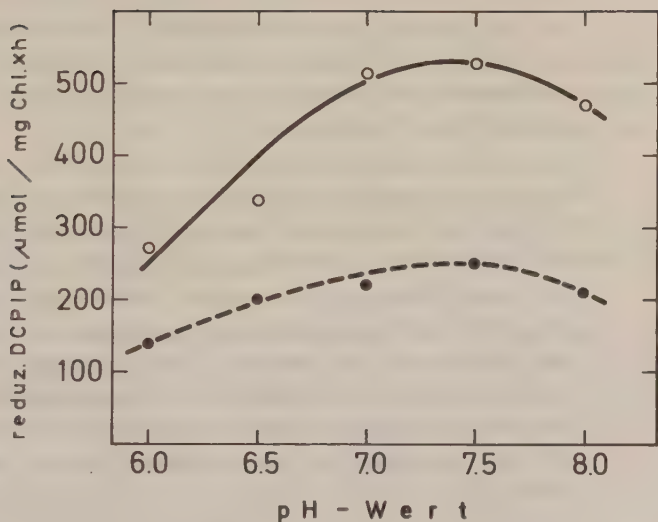


Abb. 10: Die Abhängigkeit der Hill-Reaktion mit DCPIP vom pH-Wert im Medium II. Die Entfärbung von DCPIP der Reaktion mit Chloroplastenpartikeln von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus wurde spektralphotometrisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol red. DCPIP/mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Das Anregungslicht hatte eine Wellenlänge von 657 nm und eine Intensität von  $9,5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Chloroplastenkonzentration  $15 \mu\text{g/ml}$ , DCPIP  $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ , o — o = 8. Stunde, ● ---- ● = 16. Stunde

gemessen worden (Abb. 10). Der Kurvenverlauf dieser Reaktion ist zwar etwas flacher, aber sonst ähnlich den Kurven der Hill-Reaktionen mit pBQ und Kaliumhexacyanoferrat (III) im gleichen Medium. Von pH 6,0 bis zum Maximum bei pH 7,5 steigt die Aktivität an und sinkt bei pH 8,0 wieder leicht ab.

Die Maxima der Hill-Reaktionen liegen bei der Verwendung von Medium II immer bei pH 7,5. Im Medium I sind die Aktivitäten der Chloroplastenpartikel aus der 8. Stunde des Entwicklungszyklus bei pH 8,0 etwas höher als bei pH 7,5. Der Vergleich der Aktivitäten in den beiden verwendeten Puffersystemen zeigt, daß die maximale Sauerstoffentwicklung bei den vier vergleichbaren Kurven im Medium I zwischen 14% und 42% höher ist als im Medium II. Der Kurvenverlauf ist im Medium II zur 8. und 16. Stunde parallel, im Medium I schneiden sich die Kurven, und die Chloroplastenpartikel der 16. Stunde sind bei den betreffenden pH-Werten aktiver. CURTIS et al. (1975) berichten für Chloroplastenpartikel aus Chlamydomonas, die mit Ultraschall hergestellt wurden, daß die Hill-Reaktion mit pBQ ein breites Maximum von pH 7,5 bis 8,1 in Tricine/KOH-Puffer und eine maximale Sauerstoffentwicklung von  $212 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  hat. Sowohl die Höhe als auch das pH-Optimum stimmen bei Chlamydomonas- und Scenedesmus-Chloroplastenpartikeln überein. JACOBI (1967) bestimmte das pH-Optimum für die Hill-Reaktion ganzer Spinat-Chloroplasten mit 8,7; bei geringer Desintegration durch Ultraschall sinkt das Optimum der noch recht großen, aber entkoppelten Chloroplastenfragmente auf pH 7,6. Auch in dieser Arbeit ist das pH-Optimum des mit Scenedesmus-Chloroplastenpartikeln vergleichbaren Materials nahe pH 7,5.

#### 5.1.1.2. Die Abhängigkeit der PS I-Aktivität vom pH-Wert

Für die Messung der PS I-Aktivität an Chloroplastenpartikeln wurden zwei artifizielle Donor-Akzeptor-Systeme eingesetzt. Die PS II-Aktivität wurde durch DCMU gehemmt, und als Elektronendonoren dienten red. Asc./DCPIP oder red. Asc./DAD. Als primärer Elektronenakzeptor diente Methylviologen (MV), das in Sekundärreaktionen den im Medium gelösten Sauerstoff reduziert (Näheres im Kap. 3.6.3.).

Vorversuche ergaben, daß bei pH 7,5 die Aktivität der Chloroplastenpartikel im Medium II sehr viel höher war als im Medium I, daher wurde die pH-Abhängigkeit der PS I-Aktivität nur von pH 6,0 bis pH 8,0 im Medium II gemessen.

Die Ergebnisse der in den Abbildungen 11 und 12 wiedergegebenen Versuche sind sehr ähnlich. Sowohl mit Asc./DCPIP, als auch mit Asc./DAD als Elektronendonor nimmt die Sauerstoffaufnahme gleichmäßig zu und erreicht bei pH 7,5 das Maximum. Zwischen Chloroplastenpartikeln der 8. und der 16. Stunde treten fast keine Unterschiede im Kurvenverlauf auf.

Die Sauerstoffaufnahme mit Asc./DAD als Elektronendonor ist höher als mit Asc./DCPIP als Donor. Das pH-Optimum der Asc./DCPIP-abhängigen PS I-Reaktion liegt bei Chloroplastenpartikeln von Chlamydomonas, die durch Ultraschall hergestellt wurden, bei 8,4 bis 8,7; also um etwa eine pH-Einheit höher als in der hier für Scenedesmus geschilderten Messung (CURTIS et al., 1975). HESSE et al. (1976) und NELLE et al., (1975) führten an vergleichbarem Material aus Bumilleriopsis bzw. Chlorella die gleichen PS I-Reaktionen durch. Beide Arbeitsgruppen verwenden

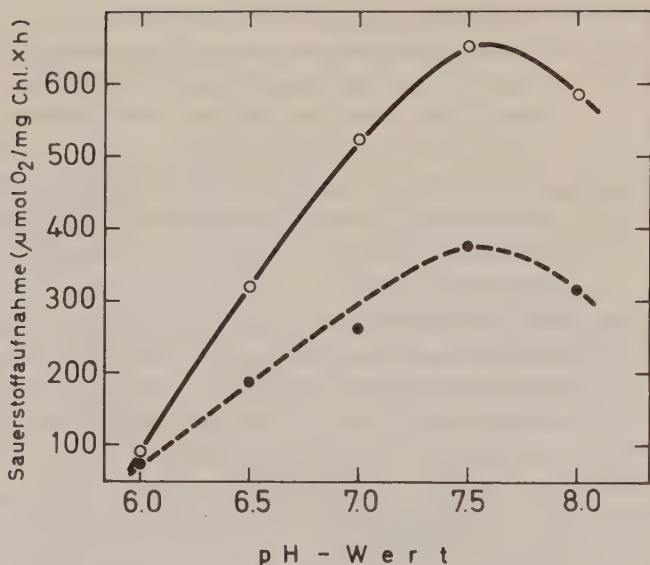


Abb. 11: Die Abhängigkeit der PS I-Reaktion mit dem Elektronendonator Asc./DCPIP und dem primären Akzeptor MV vom pH-Wert. Die Sauerstoffaufnahme der Reaktion mit Chloroplastenpartikeln von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Das Anregungslicht hatte eine Wellenlänge von  $>620 \text{ nm}$  und eine Intensität von  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Chlorophyllkonzentration  $15 \mu\text{g/ml}$ , Ascorbat  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , DCPIP  $10^{-4} \text{ M}$ , MV  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ , DCMU  $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

o — o = 8. Stunde, • ---- • = 16. Stunde

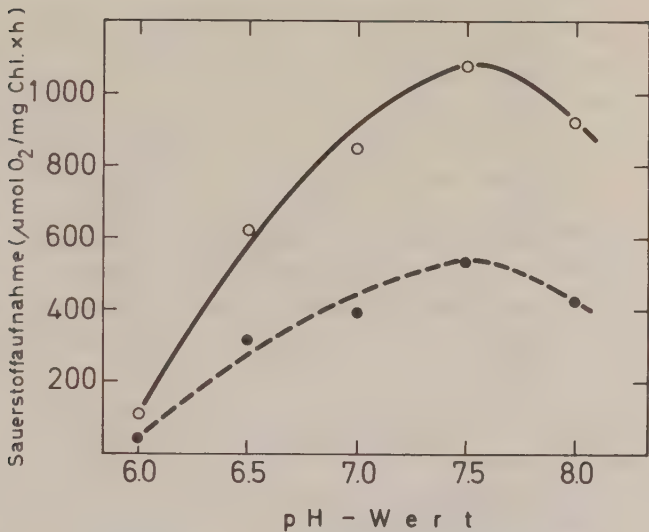


Abb. 12: Die Abhängigkeit der PS I-Reaktion mit dem Elektronendonator Asc./DAD und dem primären Akzeptor MV vom pH-Wert. Die Sauerstoffaufnahme der Reaktion mit Chloroplastenpartikeln von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Das Anregungslicht hatte eine Wellenlänge von  $>620 \text{ nm}$  und eine Intensität von  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Chlorophyllkonzentration  $15 \mu\text{g/ml}$ , Ascorbat  $\times 10^{-4} \text{ M}$ , DAD  $10^{-4} \text{ M}$ , MV  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ , DCMU  $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

○ ——— ○ = 8. Stunde, ● ---- ● = 16. Stunde

den Tricine/KOH-Puffer von pH 7,5 bzw. 8,0, ohne näher auf die pH-Abhängigkeit der Reaktionen einzugehen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß pH 7,5 der optimale pH-Wert für alle im Medium II durchgeführten Reaktionen von Photosystem I und Photosystem II ist. Dies gilt sowohl für Chloroplastenpartikel aus Zellen der 8. Stunde als auch aus Zellen der 16. Stunde des Entwicklungszyklus. Wegen der geringen Sauerstoffaufnahme durch die geschilderten PS I-Reaktionen im Medium I und der unterschiedlichen Kurvenverläufe der Hill-Reaktionen in diesem Medium, wird für alle folgenden Versuche Medium II mit pH 7,5 eingesetzt.

#### 5.1.2. Der Einfluß der Konzentration der Hill-Reagenzien auf die Aktivität

Die Wirkung von Donor- und Akzeptor-Substanzen in Photosynthesereaktionen ist entscheidend von ihrer Konzentration abhängig. So wirkt z.B. DBMIB in Scenedesmus-Zellen in Konzentrationen über  $10^{-6}$  M als Hill-Reagenz, in Konzentrationen unter  $10^{-6}$  M wirkt es aber als Hemmstoff des Elektronentransports (vgl. FLEISCHHACKER, 1975). Die von MELL (1974) verwendeten Konzentrationen für die Hill-Reaktion mit Scenedesmus-Chloroplastenpartikel waren aus der Literatur übernommen und stammen z.T. aus Arbeiten, die mit Chloroplasten bzw. Chloroplastenpartikeln aus höheren Pflanzen, oder, wie die Konzentration von pBQ, aus Arbeiten, die an ganzen Zellen von Scenedesmus durchgeführt wurden (SENGER, 1970 b). Es war also notwendig, Konzentrationsreihen zu testen, um die für dieses System geeigneten Konzentrationen zu finden.

Wie in Kap. 3.6.2. beschrieben, werden 0,5 ml pBQ bzw. Kaliumhexacyanoferrat (III) zu den 1,8 ml

Probenvolumen zugegeben, die Hill-Reagenzien müssen also 4,6-fach konzentrierter als die gewünschte Endkonzentration zugegeben werden. Dies bedeutet für das wenig wasserlösliche pBQ, daß  $5 \times 10^{-3}$  M die höchste erreichbare Endkonzentration ist. Die für die Hill-Reaktion günstigste Konzentration liegt zwischen  $0,5 \times 10^{-3}$  M und  $5 \times 10^{-3}$  M (Abb. 13). Aus technischen Gründen erscheint es daher sinnvoll, die von SENER (1970 b) für ganze Zellen verwendete Konzentration von  $3 \times 10^{-3}$  M zu wählen.

Kaliumhexacyanoferrat (III) wird nach Literaturangaben etwa  $10^{-3}$  M bis  $3 \times 10^{-4}$  M eingesetzt (z.B. GOULD und IZAWA, 1973; KOK und DATKO, 1965). Für die Hill-Reaktion mit Chloroplastenpartikeln ist diese Konzentration suboptimal, erst bei  $10^{-2}$  M wird der Anstieg flacher und bei  $5 \times 10^{-2}$  M erreicht die Hill-Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat (III) ihr Maximum (Abb. 13).

Die Aktivität ist hier fast doppelt so hoch wie bei den in der Literatur angegebenen Konzentrationen. Für hohe Aktivitäten der Hill-Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat (III) ist bei Messungen mit Scenedesmus-Chloroplastenpartikeln eine Konzentration von  $2 \times 10^{-2}$  M nötig.

Die spektralphotometrische Messung der Entfärbung von DCPIP ermöglicht eine Aktivitätsbestimmung von PS II auch dann, wenn kein Sauerstoff entwickelt wird. Durch den hohen Extinktionskoeffizienten von DCPIP ist die Reaktion sehr empfindlich. Es können daher auch nur sehr niedrige Konzentrationen an DCPIP eingesetzt werden, weil sonst die Extinktion der Lösung zu groß wird und das Meßsystem überfordert ist. Abb. 13 zeigt, daß die Aktivität von  $1,3 \times 10^{-6}$  M bis  $3,5 \times 10^{-5}$  M fast konstant bleibt und bei  $10^{-4}$  stark abgefallen ist. Die von FRICKEL-FAULSTICH (1974) mit Er-



folg eingesetzte Konzentration von  $4 \times 10^{-5}$  M liegt also noch im optimalen Bereich und soll in späteren Experimenten beibehalten werden. Diese Konzentration gestattet auch bei sehr aktiven Proben Messungen bis zu 20 sec. Dauer, während bei  $1,3 \times 10^{-6}$  M bereits nach ca. 2 sec. das zugegebene DCPIP vollständig reduziert ist.

### 5.1.3. Die Abhängigkeit der photosynthetischen Teilreaktionen von der Aufbruchsdauer

#### 5.1.3.1. Die PS II-Aktivität in Abhängigkeit von der Aufbruchsdauer

Nach zwei Minuten Homogenisieren sind ca. 50% Zellen aufgeschlossen, nach fünf Minuten 90% und nach 10 Minuten praktisch 100% (MELL, 1974). Wenn man eine Aufbruchsquote von 90% erreichen will und dafür fünf Minuten homogenisieren muß, bedeutet dies gleichzeitig, daß die Chloroplasten bzw. Chloroplastenbruchstücke von 55% der aufgeschlossenen Zellen schon nach zwei Minuten aufgeschlossen waren und in den anschließenden drei weiteren Minuten direkt, d.h. ohne schützende Zellwand, der Wirkung der Glasperlen ausgesetzt sind. Diese Überlegung wirft die Frage auf, ob es nicht besser ist, nur zwei Minuten zu homogenisieren, um evtl. besser erhaltene, d.h. aktivere Chloroplastenpartikel zu isolieren und dafür schlechtere quantitative Ausbeuten in Kauf zu nehmen.

Um diese Fragen zu untersuchen, sind wieder die Hill-Reaktionen mit pBQ, Kaliumhexacyanoferrat (III) und DCPIP untersucht worden (Abb. 14). Evtl. Unterschiede in der mechanischen Stabilität der Chloroplastenmembranen zwischen Stadien aus der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus

dürften bei den hohen Kräften, die während der Homogenisierung auftreten, nicht zu anderen Ergebnissen führen. Daher wurde dieser Versuch nur mit Zellen der 8. Stunde des Entwicklungszyklus durchgeführt.

Für die nachfolgende Auswertung wurde der höchste Wert jeder Kurve gleich 100% gesetzt.

Die Sauerstoffentwicklung der Chloroplastenpartikel, nach Abzentrifugieren der ganzen Zellen, mit pBQ als Hill-Reagenz ist nach 1,5-minütiger Homogenisierung 39% geringer als nach fünf Minuten. Weitere fünf Minuten Homogenisierung verringern die Aktivität kaum. Ähnlich sind die Kurvenverläufe bei Kaliumhexacyanoferrat (III) und DCPIP, allerdings sind hier nach 1,5 Minuten bereits 76% bzw. 79% der höchsten Aktivität erreicht. Die Reduktionsrate von DCPIP erreicht nach drei Minuten das Maximum und geht in den folgenden sieben Minuten langsam zurück bis auf 90%. Die Hill-Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat (III) erreicht nach drei Minuten eine maximale Aktivität, die auch nach 10 Minuten Homogenisierung nicht absinkt.

Nach den vorangegangenen Überlegungen zu Beginn dieses Kapitels überrascht dieser Verlauf der drei Aktivitätskurven. Da die Verlängerung der Homogenisierung über 1,5 Minuten keinen Aktivitätsrückgang zur Folge hat, scheidet eine unmittelbare Schädigung des PS II durch die Homogenisierung aus. Für die weitere Steigerung der Aktivität sind zwei Interpretationen möglich. Die zunehmende Desintegration der Chlorophyllmembranen kann entweder den Zugang der Hill-Reagenzien zu den Gliedern der Elektronentransportkette erleichtern und damit die Elektronenaufnahme beschleunigen und/oder zu einer zunehmenden Entkopplung des Elektronentransportes von der Photo-

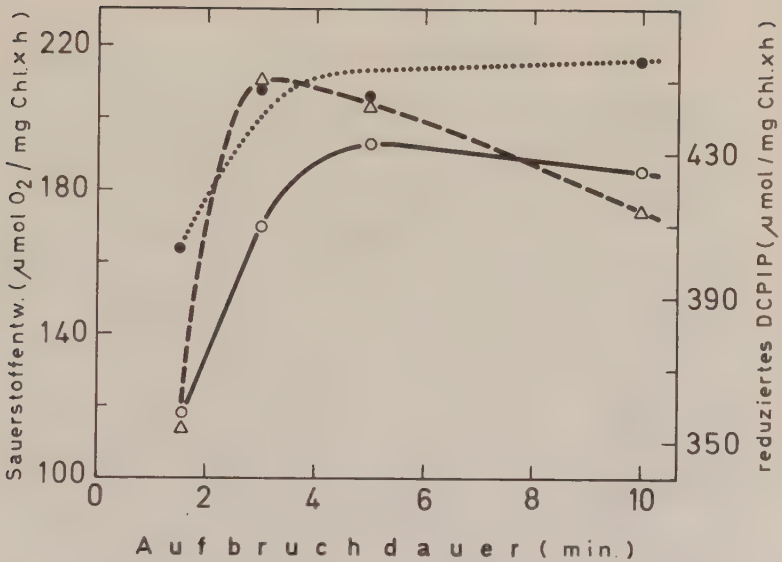


Abb. 14: Die Abhängigkeit der Hill-Reaktionen mit DCPIP, pBQ und Kaliumhexacyanoferrat (III) von der Aufbruchdauer (min). Chloroplastenpartikel von Scenedesmus obliquus zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus. Die Messung der Reaktion mit

- DCPIP ist in Abb. 10 beschrieben ( $\Delta$ --- $\Delta$ );
- pBQ ist in Abb. 6 beschrieben ( $\circ$ --- $\circ$ );
- Kaliumhexacyanoferrat (III) ist in Abb. 8 beschrieben ( $\bullet$ ..... $\bullet$ ).

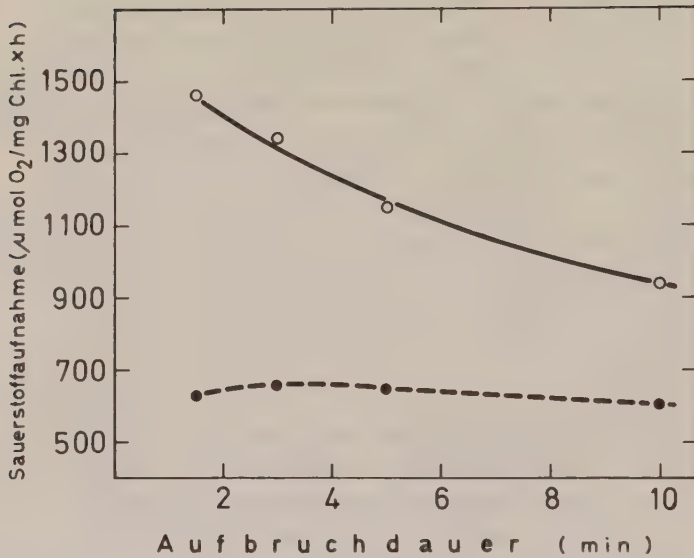


Abb. 15: Die Abhängigkeit der Aktivität von Chloroplastenpartikeln in den PSI-Reaktionen mit Asc./DCPIP bzw. Asc./DAD als Elektronendonoren von der Aufbruchdauer. Die Chloroplastenpartikel wurden aus Zellen von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus isoliert. Die Messung der Reaktion mit

- Asc./DCPIP als Elektronendonor ist in Abb. 11 beschrieben (o — o),
- Asc./DAD als Elektronendonor ist in Abb. 12 beschrieben (• ---- •).

phosphorylierung führen.

#### 5.1.3.2. Die PS I-Aktivität in Abhängigkeit von der Aufbruchsdauer

Parallel zu den Messungen der Hill-Reaktionen wurden die Auswirkungen der Aufbruchsdauer auf die PS I-Aktivität mit Asc./DCPIP und Asc./DAD als Elektronendonoren und Methylviologen als primären Elektronenakzeptor gemessen.

Abb. 15 zeigt, daß die Höhe der Sauerstoffaufnahme in der Reaktion mit Asc./DCPIP praktisch unabhängig von der Homogenisierungsdauer ist. Die Asc./DAD-abhängige Reaktion ist bei der kürzesten Homogenisierungsdauer am höchsten und nimmt mit zunehmender Homogenisierungsdauer ab. Eine Interpretation dieser Differenzen ist durch die verschiedenen Eigenschaften von DAD und DCPIP als Elektronendonoren möglich. IZAWA et al.

(1973) konnten durch folgenden Versuch zeigen, daß die DAD-Oxydation von Plastocyanin abhängig ist, während die DCPIP-Oxydation plastocyanin-unabhängig ist. KCN greift als Hemmstoff am Plastocyanin ein (OUITRAKUL und IZAWA, 1973) und blockiert die Reduktion von P-700 durch DAD. Diese Hemmstelle wird mit DCPIP umgangen und P-700 trotz KCN reduziert. Der mit zunehmender Homogenisierungsdauer zunehmende Aktivitätsverlust der DAD-abhängigen Sauerstoffaufnahme kann durch Auswaschen von löslichem Plastocyanin erklärt werden. Die Reduktion mit DCPIP ist davon nicht betroffen.

#### 5.1.4. Die Abhängigkeit der Photosynthesereaktion vom Alter der Partikel

Für die praktische Arbeit ist es wichtig zu wissen, wie schnell die Aktivität des Chloroplastenpartikelhomogenates nach der Homogenisierung zurückgeht, da bei mehreren Messungen mit einer Probe zwangsläufig Pausen auftreten. Die Hill-Reaktion mit DCPIP und die Sauerstoffaufnahme der PSI-Reaktion mit Asc./DCPIP und MV wurden exemplarisch ausgewählt, um den Aktivitätsverlust zu messen. Die Chloroplastenpartikelsuspensionen wurden wie üblich nach der Homogenisierung in Eiswasser aufbewahrt, und zur Messung wurde jeweils eine Probe entnommen. Aus Abb. 16 wird deutlich, daß die Proben während der ersten zwei Stunden nach der Homogenisierung 15% der Hill-Aktivität verlieren, dann aber relativ haltbar sind. Die PS I-Aktivität bleibt während der Versuchsdauer von über sechs Stunden praktisch konstant.

Die Aktivität beider Photosysteme ist also sehr stabil und gewährleistet, daß keine größeren Meßfehler entstehen, wenn die Proben innerhalb der normalen Versuchsdauer von höchstens drei Stunden aufgearbeitet werden.

#### 5.1.5. Zusammenfassung der Optimierung der Chloroplastenpartikel-Isolierung und ihrer Reaktionen

Im Medium II liegt das pH-Optimum für alle gemessenen Reaktionen bei pH 7,5, während im Medium I die Aktivität z.T. bei pH 8,0 ihr Optimum hat. Die Kurvenformen der Proben aus der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus sind im Medium II gleichmäßiger als im Medium I. Die

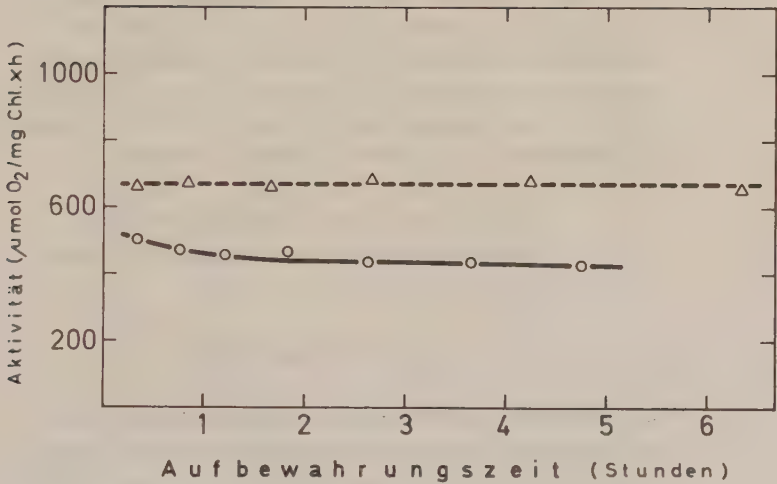


Abb. 16: Die Abhängigkeit der Aktivitäten von Chloroplastenpartikeln in der Hill-Reaktion mit DCPIP (o — o) und der PS I-Reaktion mit Asc./DCPIP (Δ ---- Δ) von der Aufbewahrungszeit der Partikel nach dem Aufbruch. Die Chloroplastenpartikel wurden aus Zellen von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus isoliert. Die Messung der Reaktion mit

- DCPIP als Hill-Reagenz ist in Abb. 10 beschrieben
- Asc./DCPIP als Elektronendonator ist in Abb. 11 beschrieben.

PS I-Reaktion ist im Medium I sehr viel niedriger. Die Aktivität der Hill-Reaktionen ist dagegen im Medium I 20% höher. Die größere Zahl der Vorteile läßt es sinnvoll erscheinen, einheitlich alle Homogenisierungen und alle Messungen im Medium II bei pH 7,5 durchzuführen. Unter diesen Bedingungen werden durch 5 Minuten Homogenisierung Chloroplastenpartikel hergestellt, die für mindestens fünf Stunden hohe Aktivität in den beiden Teilreaktionen der Photosynthese aufweisen.

## 5.2. Die Kapazität von Teilreaktionen der Photosynthese während des Entwicklungszyklus

### 5.2.1. Messung von PS II-Reaktionen

Schwankungen der Photosynthesekapazität ganzer Zellen während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus sind von SENER (1970 a,b, 1971, SENER und BISHOP (1971), SENER und FRICKEL-FAULSTICH (1974) ausführlich untersucht und beschrieben worden. Diese Messungen können nun mit den Photosynthesereaktionen der Chloroplastenpartikel unbeeinflusst durch andere Zellorganellen untersucht werden, und zusätzlich können Reaktionen gemessen werden, die mit ganzen Zellen nicht möglich sind.

Lichtintensitätskurven der Hill-Reaktionen mit pBQ, Kaliumhexacyanoferrat (III) und DCPIP zeigen bei Chloroplastenpartikeln den prinzipiell gleichen Verlauf, wie bei der Hill-Reaktion ganzer Zellen mit pBQ (Abb. 17, 18, 19), (SENER, 1970b; MELL, 1974).

Die Aktivitätsdifferenz zwischen der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus ist sowohl bei

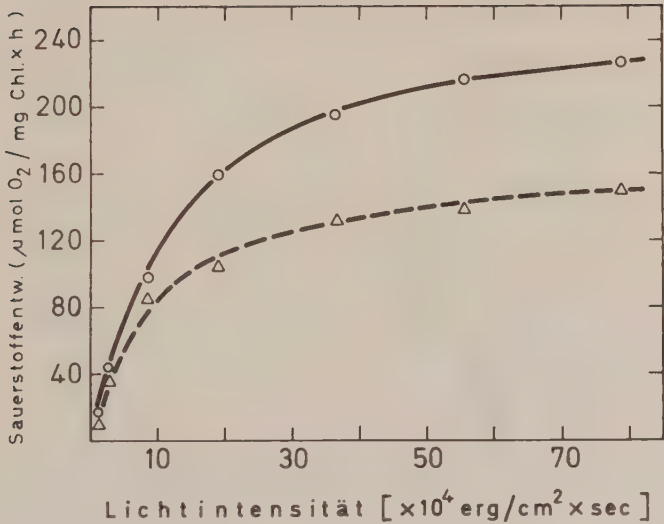


Abb. 17: Die Abhängigkeit der Aktivität von Chloroplastenpartikeln in der Hill-Reaktion mit pBQ von der Lichtintensität. Die Chloroplastenpartikel wurden aus Zellen von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus gewonnen. Die Sauerstoffentwicklung wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg chl} \times \text{h}$  angegeben. Chlorophyll  $15 \mu\text{g/ml}$ , pBQ  $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  
o — o = 8. Stunde, 4----Δ = 16. Stunde

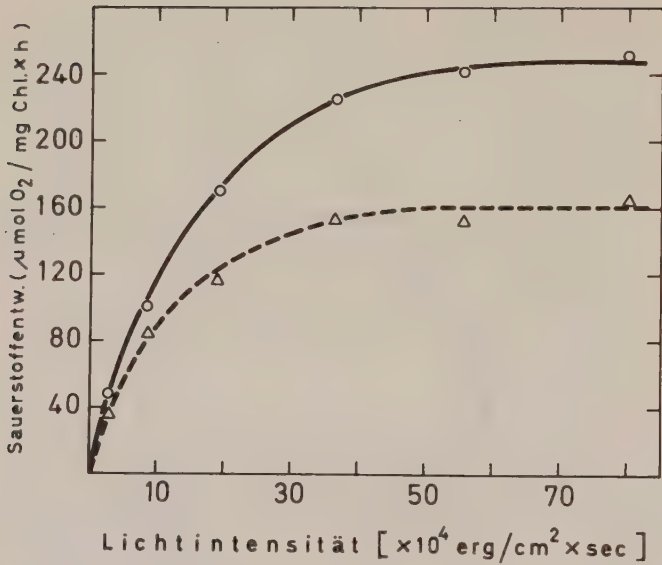


Abb. 18: Die Abhängigkeit der Aktivität von Chloroplastenpartikeln in der Hill-Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat (III) von der Lichtintensität. Die Chloroplastenpartikel wurden aus Zellen von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde gewonnen. Die Sauerstoffentwicklung wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$  angegeben. Chlorophyll  $15 \mu\text{g/ml}$ , Kaliumhexacyanoferrat (III)  $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  
 $\circ \text{ --- } \circ$  = 8. Stunde,  $\Delta \text{ ---- } \Delta$  = 16. Stunde

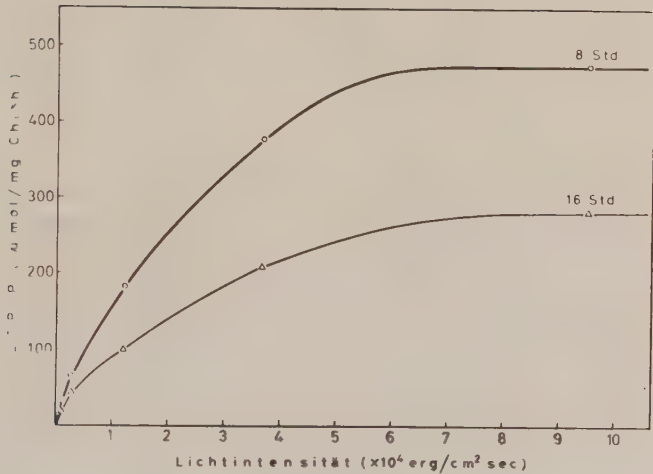


Abb. 19: Die Abhängigkeit der Aktivität von Chloroplastenpartikeln in der Hill-Reaktion mit DCPIP von der Lichtintensität. Die Chloroplastenpartikel wurden aus Zellen von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus gewonnen. Die Entfärbung von DCPIP wurde spektralphotometrisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol red. DCPIP/mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Chlorophyll  $15 \mu\text{g/ml}$ , DCPIP  $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  
 $\circ \text{ — } \circ = 8. \text{ Stunde}, \Delta \text{ ---- } \Delta = 16. \text{ Stunde}$

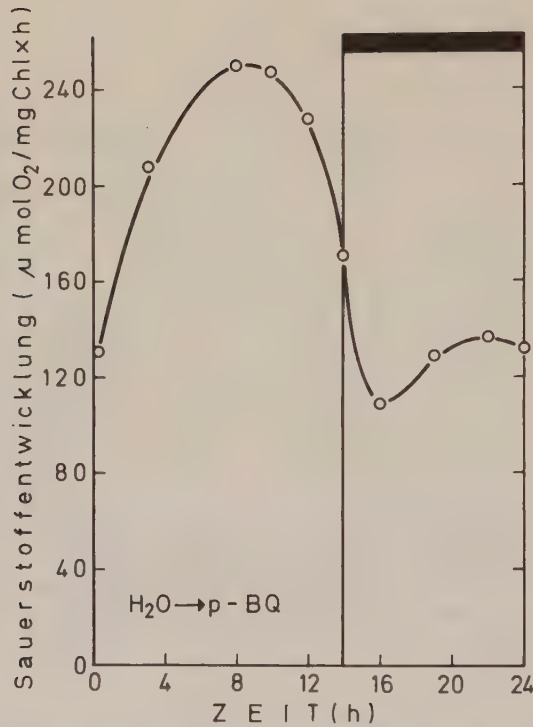


Abb. 20: Die Aktivität von Chloroplastenpartikeln aus Zellen von Scenedesmus obliquus in der Hill-Reaktion mit pBQ während des Entwicklungszyklus. Die Sauerstoffentwicklung wurde polarographisch gemessen. pBQ  $3 \times 10^{-3}M$ , Lichtintensität  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec.}$ , Lichtqualität  $> 620 \text{ nm}$ .

Zellen, als auch bei Chloroplastenpartikeln im lichtlimitierenden Bereich und bei Lichtsättigung gleich. Der Lichtsättigungsbereich wird von allen Reaktionen bei einer Lichtintensität von 3 bis  $5 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$  erreicht. Es kann also angenommen werden, daß die entwicklungsbedingten Aktivitätsschwankungen bei Zellen und Chloroplastenpartikeln die gleiche Ursache haben.

Für die Messung der PS II-Aktivität über den Entwicklungszyklus wurde die Hill-Reaktion mit pBQ gewählt, da dies die einzige Hill-Reaktion ist, von der vergleichbare Messungen an ganzen Zellen vorliegen (Abb. 20). Die Sauerstoffentwicklung durch Chloroplastenpartikel von Scenedesmus obliquus in dieser Reaktion beträgt zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus durchschnittlich  $250 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  und ist damit etwa gleich hoch wie die manometrisch bestimmte Sauerstoffentwicklung von  $249 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  durch die Photosynthese ganzer Zellen (SENGER, 1968).

In beiden Reaktionen fällt die Aktivität nach der 8. Stunde ab und erreicht zur 16. Stunde ihr Minimum. Bei ganzen Zellen beträgt der Aktivitätsrückgang in der Photosynthese 36%, bei Chloroplastenpartikeln in der Hill-Reaktion 55% und bei der Hill-Reaktion ganzer Zellen 71% (SENGER, 1970 b). Die Literaturangaben der Aktivität zu der letzten Messung sind nur relativ und erlauben keine Vergleiche der absoluten Aktivitäten.

Die Ergebnisse der Messungen mit Chloroplastenpartikeln bestätigen die Ergebnisse, die an ganzen Zellen gemessen wurden; der relative Aktivitätsrückgang ist in der Photosynthese und in den Hill-Reaktionen von Zellen und Chloroplastenpartikeln gleichsinnig. Ähnliche Ergebnisse werden auch für Chlorella, Chlamydomonas und Bumilleriopsis be-

richtet (SCHOR et al., 1970; NELLE et al., 1975; HESSE et al., 1976).

### 5.2.2. Messung von PS I-Reaktionen

Die PS I-Aktivität kann in intakten Zellen nur mit der Photoreduktion von  $\text{CO}_2$  durch  $\text{H}_2$  erfaßt werden (vgl. Kap. 2.1.4.). Diese Methode kann bei Chloroplastenpartikeln, wahrscheinlich wegen des Verlustes der Hydrogenaseaktivität, nicht mehr angewandt werden, doch ist hier der Einsatz künstlicher Elektronenakzeptoren und -donoren möglich. Die Reduktion von MV durch PS I induziert eine Sauerstoffaufnahme, die polarographisch gemessen wurde. Als Elektronendonoren wurden entweder DCPIP oder DAD eingesetzt, die durch reduziertes Ascorbat reduziert werden.

Bei beiden PS I-Reaktionen ist der Aktivitätsunterschied zwischen der 8. und der 16. Stunde des Entwicklungszyklus sowohl im lichtlimitierenden als auch im Lichtsättigungsbereich vorhanden (Abb. 21, 22). Sie gleichen also den Lichtintensitätskurven der PS II-Reaktionen, doch sind die Aktivitätsdifferenzen zwischen 8. und 16. Stunde bei den PS I-Reaktionen mit 65-70% größer als bei den PS II-Lichtintensitätskurven der Chloroplastenpartikel. Die DCPIP-abhängige Reaktion geht bei einer Lichtintensität von  $2 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$  in den Lichtsättigungsbereich über, die DAD-abhängige Reaktion erst bei etwa  $6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . In beiden Fällen flachen die Kurven der 16. Stunde etwas früher ab.

Abb. 23 zeigt die Aktivitätsänderungen der beiden Reaktionen bezogen auf Chlorophyll während des Entwicklungszyklus. Die Änderung der PS I-Aktivität verläuft in der Lichtzeit genau wie bei den

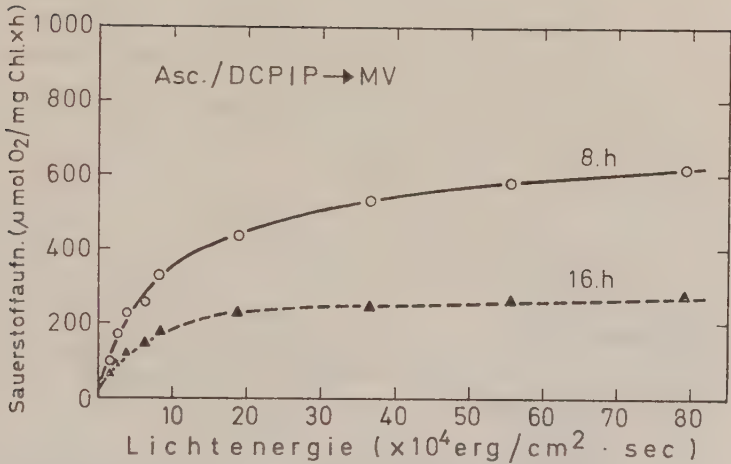


Abb. 21: Die Abhängigkeit der Aktivität von Chloroplastenpartikeln in der PS I-Reaktion mit Asc./DCPIP als Elektronendonator von der Lichtintensität. Die Chloroplastenpartikel wurden aus Zellen von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus gewonnen. Die Sauerstoffaufnahme wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Chlorophyll  $15 \mu\text{g/ml}$ , Ascorbat  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , DCPIP  $10^{-4} \text{ M}$ , MV  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ , DCMU  $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  
o ——— o = 8. Stunde, ▲ ——— ▲ = 16. Stunde

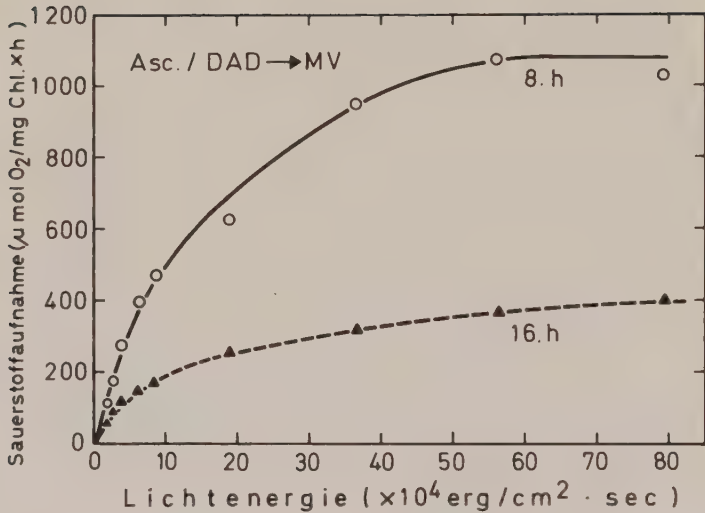


Abb. 22: Die Abhängigkeit der Aktivität von Chloroplastenpartikeln in der PS I-Reaktion mit Asc./DAD als Elektronendonator von der Lichtintensität. Die Chloroplastenpartikel wurden aus Zellen von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus gewonnen. Die Sauerstoffaufnahme wurde polarographisch gemessen und ist als  $\mu$ mol O<sub>2</sub>/mg Chl x h angegeben. Chlorophyll 15  $\mu$ g/ml, Ascorbat  $5 \times 10^{-3}$  M, DAD  $10^{-4}$  M, MV  $2 \times 10^{-4}$  M, DCMU  $2,5 \times 10^{-6}$  M,  $\circ$  —  $\circ$  = 8. Stunde,  $\blacktriangle$  ----  $\blacktriangle$  = 16. Stunde

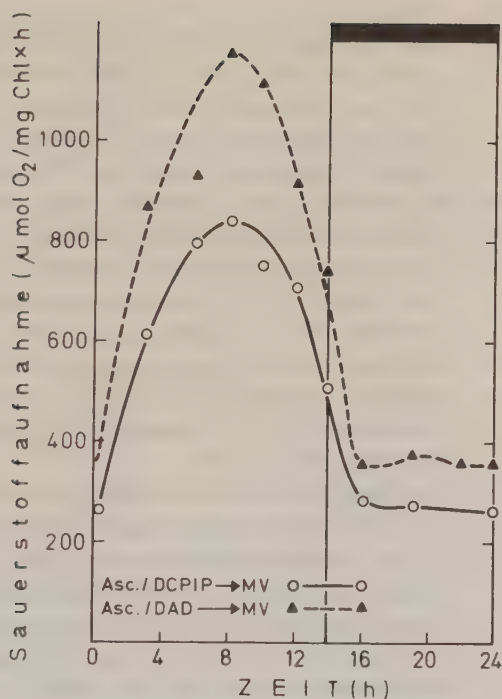


Abb. 23: Die Aktivität von Chloroplastenpartikeln aus Zellen von Scenedesmus obliquus während des Entwicklungszyklus in der PS I-Reaktion mit Asc./DCPIP bzw. Asc./DAD als Elektronendonoren. Die MV-induzierte Sauerstoffaufnahme wurde polarographisch gemessen. Lichtintensität  $7,6 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Lichtqualität  $> 620 \text{ nm}$ .

oben beschriebenen PS II-Reaktionen bzw. der Photosynthese. Zur 16. Stunde beträgt die Aktivität nur 29,5% bzw. 34,7% der Sauerstoffaufnahme mit Asc./DAD bzw. Asc./DCPIP als Donoren, bezogen auf die Aktivität der 8. Stunde. Die Aktivität beider Reaktionen bleibt auf diesem niedrigen Niveau bis zur nächsten Lichtzeit.

Diese beiden Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Befunden von SENGGER (1970 b), sowie SENGGER und BISHOP (1971) an ganzen Zellen. Sie stimmen jedoch mit den Ergebnissen, die an Chloroplastenpartikeln von Chlamydomonas (SCHOR et al., 1970), Chlorella (NELLE et al., 1975) und Bumilleriopsis (HESSE et al., 1976 und 1977) gewonnen wurden, überein.

Die Ergebnisse der Photoreduktion mit ganzen Zellen könnten theoretisch durch die zehnstündige Adaptationszeit unter  $H_2/CO_2$ -Atmosphäre nicht mehr den Zustand der Zellen zu Beginn der Experimente widerspiegeln. Die Messung der PS I-abhängigen Fluoreszenz bei Tieftemperatur (SENGGER und BISHOP, 1971) bestätigt aber die Ergebnisse ebenso wie die Aktionsspektren der Photosynthese (SENGGER, 1970a) und Absorptionsänderungen bei 520 nm (FRICKEL-FAULSTICH und SENGGER, 1972).

Der Verlauf der DAD-abhängigen Sauerstoffaufnahme in belichteten Chloroplastenpartikeln kann theoretisch ebenfalls durch ein Artefakt erklärt werden, denn die Löslichkeit von Plastocyanin könnte sich während des Entwicklungszyklus ändern (vgl. Kap. 5.1.3.2.). Der gleiche Aktivitätsverlauf bei der Plastocyanin-unabhängigen Reaktion mit DCPIP schließt diese Erklärungsweise jedoch wieder aus. Eine Erklärung der sich widersprechenden Befunde zur PS I-Aktivität in Zellen und Chloroplastenpartikeln kann bisher nicht gegeben werden.

### 5.2.3. P-700-Bestimmungen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus

Vom Begriff "Photosynthetische Einheit", nach dem englischen "photosynthetic unit" mit PSU abgekürzt, sind mehrere Definitionen in Gebrauch. Nach der ursprünglichen Formulierung von EMERSON und ARNOLD waren in der PSU die Summe der Chlorophylle zusammengefaßt, die für die Fixierung eines Moleküls  $\text{CO}_2$  (oder der Entwicklung eines  $\text{O}_2$ -Moleküls) nötig sind; die Zahlen lagen bei etwa 2000 Chlorophyllmolekülen. Diese Definition wird z.B. von MYERS und GRAHAM (1975) weiter benutzt. Teilt man diese Chlorophyllmenge durch die Anzahl der für die Reduktion notwendigen Elektronen, also 4, dann erhält man die Anzahl der Chlorophylle pro Elektronentransportkette (PS II + PS I). Anstelle der Elektronentransportkette wird oft das Reaktionszentrum von PS I, das Chlorophyll  $a_1$  = P-700 als Bezug gewählt. Diese Chlorophyllmenge, also Chlorophyll P-700 wird von BJÖRNMANN (1973) als PSU bezeichnet. Die dritte und gängigste Definition, die heute meistens gemeint ist, wenn von "photosynthetic units" geredet wird, gibt GAFFRON (1975). Danach bildet jedes Photosystem mit seinen zugehörigen Akzessorischen Chlorophyllen eine PSU. Unabhängig von der jeweiligen Definition kann das Verhältnis Chlorophyll/P-700 für die Bestimmung der PSU dienen.

Das "reaction centre chlorophyll  $a_1$ " des Photosystems I erfährt durch die Oxydation bei Belichtung eine Absorptionsänderung, die bei 430 nm und 700 nm zu seiner quantitativen Bestimmung genutzt wird (MARSHO und KOK, 1971). Diese Absorptionsänderungen können durch Belichtung oder chemisch induziert werden. Für die Bestimmung des Chlorophyll/P-700-

Verhältnisses wurde hier die chemische Methode gewählt und das Verhältnis zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus bestimmt. Wie bei Fleischhacker (1975) und ROWELL und POWLS (1976) lag das Maximum nicht genau bei 700 nm, sondern bei 696 nm. Neben dem reproduzierbar entstehenden Maximum bei 696 nm gab es ein zweites Maximum bei 680 nm, dessen Form und Höhe variierte, ohne das 696 nm Maximum zu beeinflussen (Abb. 24). Dieses zweite Maximum tritt nach vorsichtiger Extraktion der Chloroplastenpartikel mit 80%igem Aceton kaum noch auf (POWLS, mündliche Mitteilung). Eine Zuordnung dieses Maximums, z.B. zu Chlorophyll  $a_{II}$  (P 682), ist nicht möglich. Die untere Kurve in Abb. 24 wurde mit Chloroplastenpartikeln der Scenedesmus-Mutante 6E gemessen. Diese Mutante besitzt als einziges Pigment Chlorophyll a und zeigt nur PS I-Aktivität. Der 680er Peak ist hier niedriger, und die Extinktionsdifferenz bei 696 nm entspricht einem Chl/P-700-Verhältnis von 51 (vgl. OGAWA und VERNON, 1969).

Die obere Kurve zeigt ein typisches Differenzspektrum der P-700-Bestimmung. Das Spektrum ist auf eine Baseline normiert, die bei 750 nm mit dem Spektrum zur Deckung kommt. Die Ergebnisse aus je drei vergleichenden Messungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Das Verhältnis von Chlorophyll/P-700 ist zur 8. und zur 16. Stunde mit 496.7 bzw. 502.3 gleich groß und deutet darauf hin, daß es sich über den Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus nicht ändert. Dieses Ergebnis bestätigt die Messungen von MYERS und GRAHAM (1975), die ebenfalls keine Veränderungen der PSU in Synchronkulturen von Scenedesmus fanden. Ihre Messungen beruhen auf der Sauerstoffentwicklung in Blitzlichtversuchen und sie erhielten im Sinne der

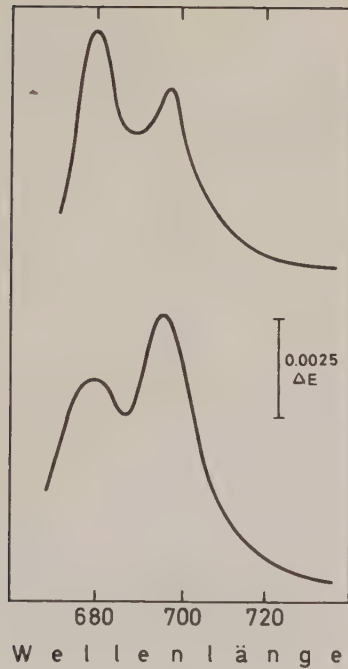


Abb. 24: Chemisch induziertes Differenzspektrum von Chlorophyll P-700 in Chloroplastenpartikeln von Scenedesmus obliquus zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus (oben) und der Mutante C-6E (unten). Ascorbat  $5 \times 10^{-3}$  M, Kaliumhexacyanoferrat (III)  $10^{-3}$  M.

ursprünglichen Definition von EMERSON und ARNOLD (Chlorophyllmoleküle/entw.  $O_2$ ) Werte um 1750 Chlorophyll für eine PSU. Das Verhältnis Chlorophyll/P-700 müßte theoretisch ein Viertel dieses Wertes, d.h. 437,5 betragen, ein Wert, der recht gut mit den hier bestimmten Zahlen übereinstimmt.

| Versuch<br>Nr. | $\Delta E$ bei<br>676 nm | 8. Stunde<br>Chl / P-700 | 16. Stunde<br>Chl / P-700 |
|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1              | 1,70                     | 537                      | 471                       |
| 2              | 0.70                     | 460                      | 563                       |
| 3              | 1.00                     | 493                      | 473                       |
| Mittelwert     |                          | 496,7                    | 502,3                     |

Tab. 1: Verhältnis von Chlorophyll/P-700 in Chloroplastenpartikeln aus Scenedesmus-Zellen der 8. bzw. 16. Stunde des Entwicklungszyklus. " $\Delta E$  bei 676 nm" ist die maximale Extinktion der Proben bei 676 nm.

#### 5.2.4. Zusammenfassung der vergleichenden Messungen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus

Die Schwankungen der Hill-Reaktion mit pBQ an ganzen Zellen über den Entwicklungszyklus, wie sie in der Literatur berichtet werden, konnten durch die vorliegenden Ergebnisse aus Untersuchungen mit Chloroplastenpartikeln bestätigt werden. Die Hill-Aktivität der Chloroplastenpartikel schwankt ebenfalls parallel zur Photosynthese über den Zyklus. Darüber hinaus gleichen sich die Lichtintensitätskurven der Photosynthese und der Hill-Reaktion ganzer Zellen, sowie die der Hill-Reaktionen von Chloroplastenpartikeln mit pBQ, DCPIP und Kaliumhexacyanoferrat (III). Der konstant bleibenden PS I-Aktivität ganzer Zellen stehen Schwankungen bei den Chloroplastenpartikeln gegenüber, die denen der Hill-Reaktion gleichen. Das Chl/P-700-Verhältnis ist dagegen in den Chloroplastenpartikeln zur 8. und 16. Stunde gleich und läßt auf eine konstante Größe der PSU während des Entwicklungszyklus schließen. Während zu PS II mit allen Messungen übereinstimmende Ergebnisse gefunden wurden, widersprechen sich scheinbar die zur Aktivität von PS I berichteten Ergebnisse. In intakten Chloroplasten von Scenedesmus treten keine Aktivitätsunterschiede auf, im Partikelhomogenat schwanken dagegen die Aktivitäten, aber das Chl/P-700-Verhältnis bleibt konstant.

Um diese Diskrepanz aufzulösen, ist es notwendig, eine weitergehende Methode einzuführen.

Die in zahlreichen Arbeiten beschriebene Isolation von PS I-Partikeln und die Messung der Reaktion mit reinen PS I-Partikeln, könnte ein Weg sein, weitere Informationen über die Schwankungen

der PS I-Aktivität während des Entwicklungszyklus zu gewinnen.

### 5.3. Herstellung und Isolation von Chloroplastensubpartikeln aus Zellen der 8. und 16. Stunde

#### 5.3.1. Die Auswahl der Desintegrationsmethode

Die Chloroplastenthylakoide von Scenedesmus sind praktisch nur mit der von SENGGER und MELL (1976) bzw. MELL (1974) näher beschriebenen und auch in dieser Arbeit verwendeten Homogenisierung der Zellen mit einer Glasperlenmühle zugänglich. Die so erhaltenen Chloroplastenpartikel sind das Ausgangsmaterial für die weitere Aufarbeitung. Im "Allgemeinen Teil" wurden bereits die gebräuchlichen Desintegrationsmethoden für Chloroplasten genannt. Zur Auswahl für die weitere Aufarbeitung der Chloroplastenpartikel stand die Anwendung von Ultraschall oder der Detergentien Digitonin bzw. Triton X - 100.

In Vorversuchen wurden Chloroplastenpartikel der 8. Stunde des Entwicklungszyklus mit jeder der drei Methoden behandelt und auf einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (10%-66% w/w) gegeben. Parallel zu den behandelten Partikeln wurden die unbehandelten Chloroplastenpartikel und unbehandelte, intakte Zellen auf gleichartige Dichtegradienten gegeben. Alle Proben wurden 14 Stunden mit  $113\,000 \times g$  zentrifugiert. Die Auftrennungen sind in den Abb. 25 und 26 abgebildet. Die unbehandelten und die mit Ultraschall behandelten Chloroplastenpartikel haben das gleiche spezifische Gewicht und bilden nur eine einzige Bande in etwa 30%iger Saccharose (w/w). Als einziger Unterschied sind in der unbehandelten Probe

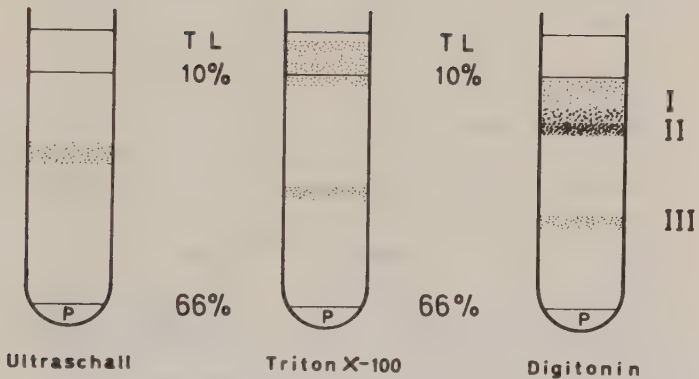


Abb. 25: Die Verteilung von Chloroplastensubpartikeln von Scenedesmus obliquus in Saccharose-Dichtegradienten ( 10-66 % w/w). Die Chloroplastensubpartikel wurden durch die Behandlung von Chloroplastenpartikeln mit Ultraschall, Triton X-100 oder Digitonin hergestellt. TL = Toplayer, P = Puffer aus 66 %iger Saccharoselösung.

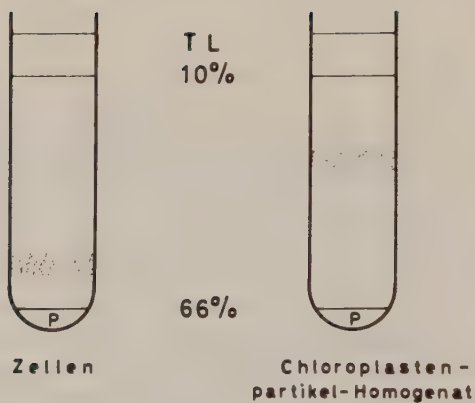


Abb. 26: Die Verteilung von Zellen und Chloroplastenpartikeln aus Zellen von Scenedesmus obliquus in Saccharose-Dichtegradienten (10 - 66 % w/w). TL = Toplayer, P = Puffer aus 66 %iger Saccharoselösung.

Flocken aggregierter Thylakoide zu erkennen, während die Ultraschall-behandelte Probe homogen erscheint.

Die für eine Stunde mit 1% Triton X - 100 behandelte Probe bildete in ca. 38%iger Saccharose eine schwache Bande, während der Hauptteil des Chlorophyll-haltigen Materials praktisch nicht in den Gradienten eindrang und im Toplayer (TL) verblieb. Der Versuch, diesen Überstand in einem zweiten Dichte-Gradienten von 0%-10% Saccharose (w/w) aufzutrennen, scheiterte ebenfalls. Nach 20-stündiger Zentrifugation mit  $113\,000 \times g$  hatte sich das Chlorophyll-haltige Material in den oberen beiden Dritteln des Gradienten verteilt, ohne sich weiter aufzutrennen.

Die ebenfalls für eine Stunde mit 1% Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikel bildeten im Dichtegradienten drei unterscheidbare, gefärbte Partikelbanden. Die leichtesten Partikel (I) erstreckten sich von 10% - 20% des Gradienten und überschritten sich so z.T. mit den Ausläufern der nächsten Bande (II). Das meiste Material der Bande II befand sich in dem Bereich von 21%-25%, aber Teile liefen in das untere Drittel der leichteren Bande nach oben aus. Eine dritte Partikelbande (III) befand sich in 46%iger Saccharose.

Von den drei getesteten Desintegrationsmethoden erwies sich die Wirkung von Digitonin als am besten geeignet, Chloroplastenthylakoide in Fraktionen unterschiedlichen spezifischen Gewichtes zu zerlegen. Derartige Fraktionen können eines der Photosysteme rein oder angereichert enthalten, wie in einer Reihe von Arbeiten gezeigt wurde (WESSELS et al., 1971, 1973, 1974; KOK und RURAISKY, 1966). Die Dichtegradientenzentrifu-

gation wurde der Differentialzentrifugation vorgezogen, weil diese Methode eine leichte und zuverlässige Kontrolle jeder Desintegration und Auftrennung ermöglicht. Ein Nachteil der Methode sind die zunehmenden, osmotischen Kräfte durch die steigende Zuckerkonzentration.

### 5.3.2. Die Wirkung von Digitonin

Digitonin ist ein Steroidsaponin mit einem verzweigten bisglucosid-bisgalactosid-xylosid-Rest. In der Analytik wird seine Eigenschaft, mit Sterolen 1:1 Additionsverbindungen einzugehen, zur quantitativen Bestimmung von Cholesterin angewandt. Die Sterole können in Zellen mit höheren Fettsäuren Ester bilden; diese Stoffgruppen sind u.a. Bestandteile der Chloroplastenmembran. Legt man nun das "Fluid-Mosaic-Model" (vgl. ANDERSON, 1975) der Chloroplastenmembran zugrunde, dann kann man sich vorstellen, daß Digitonin Teile der lipoiden Membranismatrix herauslöst und so sukzessive die Chloroplastenmembranen abbaut. Die nicht abgebauten Proteinkomplexe bleiben übrig und können isoliert werden, wie dies z.B. WESSELS und VOORN (1972) mit PS I-Partikeln erreicht haben.

Die primäre Wirkung auf die Photosynthesereaktionen in isolierten Chloroplasten beschreiben ROBINSON und WISKICH (1975 a, 1975 b). Digitonin wirkt in geringen Konzentrationen entkoppelnd und steigert daher den Elektronentransport, also auch die Sauerstoffentwicklung. Bei höheren Digitonin-Konzentrationen wird zwar am Anfang auch diese Phase durchlaufen, doch dann geht die Sauerstoffentwicklung stark zurück, was auf eine irreparable Schädigung des wasserspaltenden

Systems zurückgeführt wird. Der Elektronentransport durch Photosystem I wird erst bei sehr hohen Konzentrationen durch den Verlust an Plastocyanin beeinträchtigt.

Der Naturstoff Digitonin ist nicht als chemisch einheitliche Substanz lieferbar. Daher wurde Digitonin der Firmen Merck, Darmstadt und Serva, Heidelberg, auf ihre desintegrierende Wirkung auf die Chloroplastenpartikel geprüft. Beide resultierenden Auftrennungen im Dichtegradienten entsprechen der Digitoninprobe in Abb. 25. Ein weiteres Problem ist die schlechte Löslichkeit von Digitonin. Die notwendige Menge für die 2%ige Stammlösung löste sich nur in der Hitze (85°C). Vergleichend wurden die Wirkungen auf Chloroplastenpartikel einer in Hitze gelösten Digitoninlösung und einer Digitoninsuspension, die entsteht, wenn man das Digitonin 15 Stunden in kaltem Lösungsmittel rührt, geprüft. Bei der kalt angesetzten Digitoninsuspension trat im Dichtegradienten eine zusätzliche Bande in etwa 65%iger (w/w) Saccharose-Lösung auf, die durch ungelöstes Digitonin gebildet wird. Durch mitgerissenes, Chlorophyll enthaltendes Material war diese Bande grün gefärbt und zeigte unspezifische Photosynthesereaktionen. Die Auftrennungen der drei oberen Banden entsprachen in beiden Fällen der mit Digitonin behandelten Probe in Abb. 25, doch waren die Banden der Digitoninsuspension durch das mitgerissene Material in der Digitoninbande schwächer ausgebildet.

Für die weiteren Versuche wurde das Digitonin durch Erwärmen vollständig im Medium II gelöst und die 2%ige, kalte Lösung mit der Chloroplastenpartikelsuspension im Verhältnis 1 : 1 gemischt.

### 5.3.3. Vergleichende Charakterisierung Digitonin-behandelter Chloroplastenpartikel der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus

#### 5.3.3.1. Die Auftrennung im Saccharose-Dichtegradienten

Die Chloroplastenpartikel der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus, deren Photosynthesereaktionen im Kap. 5.2. beschrieben sind, wurden je in 1%iger Digitoninlösung eine Stunde lang gerührt und, wie beschrieben, im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Obwohl bei vollständig gelöstem Digitonin keine schwere, vierte Bande zu erwarten ist (s. Kap. 5.3.2.) wurde weiterhin mit einem Dichtegradienten von 10% - 66% (w/w) gearbeitet. Hierdurch können evtl. Unregelmäßigkeiten, wie ausfallendes Digitonin oder nicht vollständig abgetrennte, ganze Zellen (Abb 26), leicht erkannt werden. Die nach Digitonin-Behandlung aufgetrennten Chlorophyll-haltigen Fraktionen werden im nachfolgenden Text mit "Chloroplasten-subpartikel" oder einfach "Subpartikel" bezeichnet.

Die Auftrennung der Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikel der 8. bzw. 16. Stunde des Entwicklungszyklus zeigt Abb. 27. Die Fraktionierung und Verteilung der Chloroplastensubpartikel im Dichtegradienten ist bei beiden Entwicklungsstadien gleich. Auch in der Färbung konnten mit dem Auge keine Unterschiede festgestellt werden. Da nach 24-stündiger Zentrifugation, im Vergleich zu 12-stündiger Zentrifugation, keine Änderungen in der Verteilung der Dichtegradientenbanden mehr auftraten, kann angenommen werden, daß es sich nach zwölf Stunden um eine isopyknische Zentrifugation handelt. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Chloroplastenthylakoide während der Entwicklung der Zellen keinen Veränderungen unterlie-

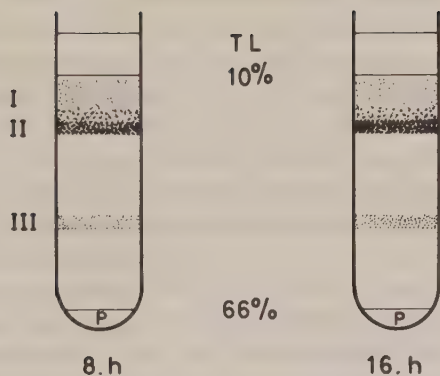


Abb. 27: Die Verteilung von Chloroplastensubpartikeln, die durch Behandlung von Chloroplastenpartikeln aus Zellen von Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus mit Digitonin erhalten wurden, im Saccharose-Dichtegradienten (10 - 66 % w/w). TL = Toplayer, P = Puffer aus 66 %iger Saccharoselösung.

gen, die das spezifische Gewicht einer oder mehrerer Pigment-tragender Strukturen verändert.

#### 5.3.3.2. Aktivität der Chloroplastensubpartikel in Teilreaktionen der Photosynthese

Die drei unterscheidbaren Banden im Saccharose-Dichtegradienten wurden, wie im Kap. 4.5 beschrieben, isoliert und für die Messung von Teilreaktionen der Photosynthese eingesetzt. Da die für diese Versuche hauptsächlich verwendeten "kleinen Gradienten" nur kleine Mengen an Subpartikeln lieferten, konnten je Präparation nur wenige Reaktionen durchgeführt werden, die möglichst effektiv sein sollten. Vorversuche mit den Subpartikelfraktionen zeigten, daß die Methylviologen-induzierte Sauerstoffaufnahme der PS I-Reaktion mit Asc./DAD als Donorsystem sehr viel geringere Aktivitäten ergab als mit Asc./DCPIP. Dieses Ergebnis ist zwar genau entgegengesetzt zu den Messungen mit Chloroplastenpartikeln (vgl. Kap. 5.2.2.), war aber zu erwarten, denn die Wirkung von Digitonin auf Plastocyanin mußte zu einem Abfall des Elektronentransportes von DAD zum P-700 führen. Die Donorwirkung von DCPIP wird dagegen nicht durch den Verlust von Plastocyanin in den Subpartikeln betroffen, da die P-700-Reduktion durch DCPIP auch ohne Plastocyanin funktioniert (vgl. Kap. 5.1.3.2). Für die vergleichenden Aktivitätsmessungen mit Subpartikeln der 8. bzw. 16. Stunde wurde daher ausschließlich die PS I-Reaktion mit Asc./DCPIP als Elektronendonator gemessen. Die PS II-Aktivität der Subpartikel konnte nur spektralphotometrisch mit DCPIP als Elektronenakzeptor gemessen werden, da das wasserspaltende System durch das Digitonin zerstört wird und keine Sauerstoffentwicklung gemessen werden

konnte.

Als Elektronendonator wurde daher DPC eingesetzt, welches eine Reduktion von DCPIP durch PS II bei Belichtung ermöglicht (VERNON und SHAW, 1969). Ein weiteres Problem waren die ansteigenden Saccharosekonzentrationen in den Fraktionen, deren Einfluß auf die Photosynthesereaktionen nicht bekannt waren. Die Saccharose wurde durch Dialyse der Fraktionen entfernt. Hierzu wurden je 10 ml Suspension jeder Fraktion in Dialyseschlauch (Kalle AG., Wiesbaden) gefüllt und in einem 4 l-Behälter bei 4°C im Dunkeln unter Rühren gegen saccharosefreies Medium II dialysiert. Nach 10-stündiger Dialyse ergaben Vergleichsmessungen keine Veränderung der Aktivitäten in den PS II und PS I-Aktivitäten.

Nach dem Ergebnis wurden die Fraktionen in den folgenden Versuchen direkt nach der Isolation aus den Dichtegradienten, für die Aktivitätsmessungen verwendet.

Mit jeder der drei im Dichtegradienten aufgetrennten Fraktionen wurde die PS I-Reaktion " $\text{Asc. / DCPIP} \longrightarrow \text{MV}$ " und PS II-Reaktion " $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{DCPIP}$ " und " $\text{DPC} \longrightarrow \text{DCPIP}$ " gemessen. Die Aktivitäten sind in den Tabellen 2 und 3 als  $\mu\text{mol red. Substanz/mg Chl} \times \text{h}$  angegeben. Jede der angegebenen Zahlen ist der Durchschnittswert aus mindestens fünf Messungen.

In Tab. 2 sind die PS II-Aktivitäten der Subpartikelfractionen zusammengefaßt. Fraktion I zeigt keinerlei Hill-Aktivität und auch nach Zugabe von DPC ist keine DCPIP-Reduktion meßbar. Dies läßt darauf schließen, daß sich keine PS II-Partikel in der obersten Bande der Dichtegradienten beider Entwicklungsstadien befinden. In Fraktion II ist eine sehr schwache Hill-Reaktion meßbar, die jedoch fast an der Erfassungs-

grenze des Meßwertes liegt. Sie ist in beiden Entwicklungsstadien gleich niedrig, wird aber durch Zugabe von DPC unterschiedlich stark gesteigert. Zur 8. Stunde des Entwicklungszyklus steigt die Aktivität mit DPC auf das 5-fache und zur 16. Stunde auf das 2,5-fache des Wertes ohne DPC an. Die Aktivitätsdifferenz zwischen der 8. und 16. Stunde beträgt 47% und liegt damit zwischen den Werten der Hill-Reaktionen ganzer Zellen mit 71% und der Chloroplastenpartikel mit 39,4%. Fast das gleiche Ergebnis ist in der Hill-Reaktion mit Fraktion II erzielt worden. Bei DPC-Zugabe veränderte sich hier aber die Aktivität von 20,6 bzw. 9,1 auf 15,7 bzw. 10,8  $\mu\text{mol red. DCP/IP/mg Chl} \times \text{h}$ . Die Subpartikel in Fraktion III haben also noch ein aktives wasserspaltendes System, das allerdings nur etwa 5% der Aktivität der Chloroplastenpartikel aufweist. Trotz dieses Aktivitätsverlustes ist auch hier noch eine Aktivitätsdifferenz zwischen Subpartikeln der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von etwa 50% erhalten geblieben. Die geringere Aktivität mit DPC könnte auf die Spuren von Alkohol, in dem DPC gelöst werden mußte, zurückgeführt werden, obwohl diese einzige Interpretationsmöglichkeit nicht voll befriedigt.

Die PS I-Aktivitäten der Subpartikelfractionen ist in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Fraktion I zeigt eine sehr hohe Aktivität von 2920 bzw. 3292  $\mu\text{mol red. O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$ , das ist das 3,5- bzw. 11,2-fache der Aktivität der Chloroplastenpartikel zur 8. bzw. 16. Stunde des Entwicklungszyklus (vgl. Kap. 5.2.2.). Die Aktivitätsdifferenzen zwischen 8. und 16. Stunde der Chloroplastenpartikel sind in den Subpartikeln praktisch völlig ausgeglichen, wenn man von der 11% höheren Aktivität zur 16. Stunde (!) absieht.

| Fraktion | $H_2O \longrightarrow$ DCPIP |          | DPC $\longrightarrow$ DCPIP |          |
|----------|------------------------------|----------|-----------------------------|----------|
|          | 8. Std.                      | 16. Std. | 8. Std.                     | 16. Std. |
| I        | 0                            | 0        | 0                           | 0        |
| II       | 4,06                         | 4,04     | 20,3                        | 10,8     |
| III      | 20,6                         | 9,1      | 15,7                        | 10,8     |

Tab. 2: PS II-Aktivität der Chloroplastensubpartikel zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Die Konzentrationen der Reagenzien betrugen: DCPIP  $4 \times 10^{-5}$  M, DPC  $10^{-3}$  M. Die Werte entsprechen  $\mu\text{mol red. DCPIP/mg Chl.} \times \text{h}$ .

| Fraktion | Asc./DCPIP $\longrightarrow$ MV |            |
|----------|---------------------------------|------------|
|          | 8. Stunde                       | 16. Stunde |
| I        | 2920                            | 3292       |
| II       | 286                             | 288        |
| III      | 170                             | 85         |

Tab. 3: PS I-Aktivität der Chloroplastensubpartikel zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Die Konzentration der Reagenzien betrug: Ascorbat  $5 \times 10^{-3}$  M, DCPIP  $10^{-4}$  M, MV  $2 \times 10^{-4}$  M. Die Werte entsprechen  $\mu\text{mol } O_2/\text{mg Chl.} \times \text{h}$

Ebenfalls ohne signifikante Differenz sind die Werte in Fraktion II, doch ist die absolute Aktivität auf das 0,34 bzw. 0,98-fache der Chloroplastenpartikel zur 8. bzw. 16. Stunde gesunken. In Fraktion III sind die Subpartikel zur 8. Stunde wieder um 50% aktiver als zur 16. Stunde, doch ist hier die absolute Aktivität mit 170 (0,20-fache) bzw. 85 (0,29-fache)  $\mu\text{mol red. O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  sehr viel geringer als bei den Chloroplastenpartikeln.

Nach diesen Aktivitätsmessungen kann folgende Klassifizierung vorgenommen werden:

Fraktion I enthält Partikel mit sehr hohen PS I-Aktivitäten, eine Verunreinigung durch PS II ist nicht vorhanden. Es besteht kein Unterschied zwischen den Subpartikeln der Fraktion I der 8. und 16. Stunde.

Fraktion II enthält PS II-Partikel, deren wasserspaltendes System defekt ist. Die Subpartikel der 16. Stunde haben 47% geringere Aktivität. Die PS I-Aktivität ist zu beiden Entwicklungsstadien gleich, insgesamt aber relativ niedrig.

Fraktion III enthält PS II-Partikel mit aktivem wasserspaltenden System und ca. 50% Aktivitätsdifferenz in der Hill-Reaktion und in der sehr niedrigen PS I-Reaktion zwischen 8. und 16. Stunde.

Aus diesen Befunden läßt sich nicht entscheiden, ob die PS I-Aktivität in Fraktion II eine Verunreinigung durch die Überlappung mit Fraktion I ist oder ob sie typisch für diese Partikel ist. Die aktive Wasserspaltung in Fraktion III und die bestehende 50%ige Aktivitätsdifferenz zwischen der 8. und 16. Stunde lassen vermuten, daß diese Fraktion aus nicht völlig desintegrierten Thyla-

koiden besteht.

Um diese offenen Fragen zu klären, wurde zunächst versucht, die Fraktionen weiter zu desintegrieren. Hierzu wurden je 10 ml jeder Subpartikelfraktion aus "Zonal-Dichtegradienten" isoliert und erneut in der gleichen Weise wie die Chloroplastenpartikel mit Digitonin behandelt und in einem "kleinen Gradienten" ein zweites Mal aufgetrennt. Das Resultat war in allen sechs Fällen eindeutig: weder die drei Fraktionen der 8. Stunde noch die drei Fraktionen der 16. Stunde wurden weiter desintegriert. Die Fraktionen bandeten genauso im Dichtegradienten wie bei der ersten Trennung. Dieses Ergebnis zeigt, daß Fraktion III aus selbständigen Subpartikeln gebildet wird und keine unabgebauten Thylakoidreste enthält.

Als weitere Kontrolle wurde die Scenedesmus-Mutante C-6E (OGAWA und VERNON, 1970) nach der beschriebenen Methode homogenisiert und die Chloroplastenpartikel mit Digitonin desintegriert und im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Bevor das Ergebnis diskutiert wird, müssen die wichtigsten Charakteristika der Mutante genannt werden. Die Scenedesmus-Mutante C-6E besitzt nur Chlorophyll a, kein Chlorophyll b, keine Carotinoide und zeigt ausschließlich PS I-Aktivität. In den hier hergestellten Chloroplastenpartikeln betrug die Asc./DCPIP-abhängige Sauerstoffaufnahme durch die PS I-Reaktion ca.  $4000 \mu\text{mol red. O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$ ; zum Vergleich der Wildtypwert:  $844 \mu\text{mol red. O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  zur 8. Stunde. Diese hohe Aktivität ist sicher auf kleine, effektiv arbeitende PS I zurückzuführen ( $\text{Chl/P-700} = 51$  vgl. Kap. 5.2.3. und OGAWA und VERNON, 1970).

Die Auftrennung im Dichtegradienten ergibt nur

zwei blaugrüne Banden (Abb. 28). Eine breite, gering konzentrierte Bande  $I_{6E}$ , die sicher mit der Fraktion I des Wildtyps verglichen werden kann und sehr hohe PS I-Aktivitäten (ca. 9000  $\mu\text{mol red. O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$ ) aufweist, sowie einer etwas abgesetzten, scharfen, konzentrierten Bande, die mit  $II_{6E}$  bezeichnet wurde. Eine weitere Bande trat nicht auf. Der Umstand, daß die Bande  $II_{6E}$  von der Bande  $I_{6E}$  abgesetzt ist und Bande  $I_{6E}$  ebenso breit ist wie Fraktion I des Wildtyps, deuten darauf hin, daß die obere Bande vom Wildtyp und der Mutante homologisiert werden dürfen. Ob die Fraktion II mit  $II_{6E}$  homolog ist, bleibt fraglich. Erstens ist Bande  $II_{6E}$  wesentlich schmaler als Fraktion II und ist von Bande  $I_{6E}$  klar abgesetzt, während sich beim Wildtyp die beiden oberen Fraktionen überschneiden. Zweitens enthält Bande  $II_{6E}$  keinerlei PS II-Aktivität wie die Fraktion II, aber noch eine PS I-Aktivität von ca. 1000  $\mu\text{mol red. O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$ .

Weitere Befunde zu diesem Problemkreis können aus Ergrünungsversuchen der Scenedesmus-Mutante C-6D entnommen werden. Parallel zu dieser Arbeit entstand im gleichen Labor eine Arbeit zur o.g. Ergrünung (STRASSBERGER, 1977). Im Rahmen der anderen Arbeit wurde die in dieser Arbeit entwickelte Subpartikelfraktionierung auch auf die ergrünenden Stadien der Mutante C-6D übertragen. Die Scenedesmus-Mutante C-6D enthält im Dunkeln nur wenig Chlorophyll a sowie viele azyklische Carotinoid-Vorstufen (Carotine) aber kein Chlorophyll b. Zu Beginn der Ergrünung zeigt diese Mutante ebenfalls nur PS I-Aktivität und im Dichtegradienten treten ähnliche Banden auf wie bei der Mutante C-6E. Fast die gesamte PS I-Aktivität konzentriert sich aber auf Bande  $I_{6D}$ . Während



Abb. 28: Die Verteilung von Chloroplastensubpartikeln, die durch Behandlung von Chloroplastenpartikeln der Scenedesmusmutante C-6E mit Digitonin erhalten wurden, in einem Saccharose-Dichtegradienten (10 - 66 % w/w). TL = Toplayer, P = Puffer aus 66 %iger Saccharoselösung.

der Ergrünung wandert die Bande  $II_{6D}$  nach oben und überlappt mit Bande  $I_{6D}$ , so daß das gleiche Bild wie beim Wildtyp entsteht. Parallel entwickelt sich in dieser Bande  $II_{6D}$ , die zu Beginn keine PS II-Aktivitäten zeigte, PS II-Aktivität, und es entsteht simultan eine Bande  $III_{6D}$ , die in ihren Charakteristika der Fraktion III des Wildtyps entspricht.

Zusammenfassend ist also zu sagen, daß die Befunde aus den Versuchen mit den Scenedesmus-Mutanten C-6E und C-6D keine endgültige Entscheidung darüber zulassen, ob die PS I-Aktivität in Fraktion II durch Verunreinigungen durch Fraktion I zustande kommt, oder ob die PS I-Aktivität eine Eigenschaft der Subpartikel von Fraktion II ist. Da aber die Besonderheiten der Bande  $II_{6E}$  darauf hindeuten, daß diese Bande eine Folge der Mutation sein könnte und nicht der Fraktion II entspricht, und da die PS I-Aktivität in Bande  $II_{6D}$  der ergrünenden Scenedesmus-Mutante 6D erst bei beginnender Überlappung mit Bande  $I_{6D}$  auftritt, kann mit der nötigen Vorsicht die Vermutung aufgestellt werden, daß in Fraktion II PS II-Partikel vorliegen und die PS I-Aktivität auf Verunreinigungen zurückgeführt werden muß.



Carotine erfolgte auf der Schicht B nach HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966) mit dem Laufmittel von WILLIAMS (1971) für Carotin (Isooctan: Isopropanol 100 : 1). Die Xanthophylle wurden ebenfalls auf der Schicht B, aber mit dem Laufmittel 1 nach HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966) getrennt.

- a) Die Carotine (vgl. Abb. 3) trennten sich in 81,7%  $\beta$ -Carotin und 18,3%  $\alpha$ -Carotin auf. Die DC-Gesamtfraktion wird im folgenden einfachheitshalber mit " $\beta$ -Carotin" bezeichnet.
- b) Die nächste DC-Carotinoidfraktion, die vierte Pigmentfraktion des Verteilungschromatogramms enthielt 98,3% all-trans-Lutein und 1,7% Zeaxanthin. Diese Fraktion wird mit "Lutein" bezeichnet.
- c) Die fünfte DC-Pigmentfraktion war in allen Chromatogrammen sehr schwach. Auch sie besteht aus mindestens zwei DC-Unterfraktionen, doch konnte nur das überwiegende Lutein-5,6-Epoxid identifiziert werden. Im weiteren Text wird die DC-Fraktion mit überwiegend (üw.) Lutein-Epoxid bezeichnet.
- d) Die sechste DC-Pigmentfraktion besteht zu 77,4% aus Violaxanthin und zu 22,6% aus einem Trihydroxi- $\alpha$ -Carotinoid, das vermutlich mit dem Loroxanthin von AIZETMÜLLER et al. (1969) bzw. FRANCIS et al. (1975) identisch ist. Die Fraktion wird mit "üw. Violaxanthin" bezeichnet.
- e) Die unterste Pigmentfraktion besteht nur aus Neoxanthin.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß es sich bei diesen Angaben um Werte einer Messung handelt,

die nur einen Eindruck von der Zusammensetzung der im übrigen als jeweils einheitlich behandelten fünf Carotinoidfraktionen geben soll.

Die Überschneidung von Bande I mit Bande II gestattete es nicht, das gesamte Chlorophyll-haltige Material aus dem Dichtegradienten zu isolieren. Die prozentuale Verteilung des Chloroplastenpartikelmaterials in den drei Dichtegradientenfraktionen konnte daher nicht gemessen werden. Die Bestimmung der Konzentration der Pigmente war daher nur innerhalb jeder Dichtegradientenfraktion möglich und wurde auf Chlorophyll a = 100% bezogen.

Die Ergebnisse der DC-Gruppentrennungen der Pigmente aus dem Ausgangsmaterial der Präparation und der Dichtegradientenfraktionen sind in den Tabellen 6 bis 9 zusammengefaßt. Jeder Wert repräsentiert den Durchschnitt von mindestens vier Messungen. In Tabelle 4 sind die Chlorophyll a/b-Verhältnisse und die Verhältnisse Gesamtchlorophyll : Gesamtcarotinoide für das Ausgangsmaterial und die Dichtegradientenfraktionen zusammengestellt. Da sich die Zellen und die Chloroplastenpartikel in ihrer Pigmentzusammensetzung nicht unterscheiden, hierauf deuteten die Tief-temperaturabsorptionsspektren bereits hin (SENGER und MELL, 1976), sind beide Systeme in einer Tabelle zusammengefaßt worden (Tabelle 4).

Das Chlorophyll a/b-Verhältnis von Scenedesmus obliquus ist mit 4,3 höher als das höherer Pflanzen mit durchschnittlich 3,0. Es stimmt aber mit dem von SENGER (1968) bestimmten Wert überein. In Fraktion I ist dieses Verhältnis mit 5,0 bzw. 5,3 höher, in Fraktion II mit 3,2 bzw. 3,4 niedriger und in Fraktion II wieder etwas höher als im Ausgangsmaterial der 8. bzw. 16. Stunde. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den jeweiligen

|              | Chlorophyll<br>a/b-Verhältnis |          | Chlorophyll<br>Carotinoide |          |
|--------------|-------------------------------|----------|----------------------------|----------|
|              | 8. Std.                       | 16. Std. | 8. Std.                    | 16. Std. |
| Ausgangs-    |                               |          |                            |          |
| material     | 4,3                           | 4,4      | 2,93                       | 3,15     |
| Fraktion I   | 5,0                           | 5,3      | 0,81                       | 1,01     |
| Fraktion II  | 3,2                           | 3,4      | 2,44                       | 3,09     |
| Fraktion III | 4,7                           | 4,8      | 5,08                       | 3,04     |

Tab. 4: Die relativen Mengenverhältnisse von Chlorophyll a und b zueinander und das Verhältnis ihrer Summe zur Summe der Carotinoide. Die Werte wurden für das Ausgangsmaterial (Zellen bzw. Chloroplastenpartikel) und die Subpartikelfraktionen I, II und III synchron wachsender Scenedesmus obliquus zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus berechnet.

|                   | 8. Stunde | 16. Stunde |
|-------------------|-----------|------------|
| β-Carotin         | 1,3       | 1,2        |
| Lutein            | 4,1       | 3,2        |
| üw. Lutein-Epoxid | 5,0       | 2,3        |
| üw. Violaxanthin  | 5,3       | 3,4        |
| Neoxanthin        | 2,3       | 2,5        |

Tab. 5: Quotient aus der Häufigkeit der Carotinoide in den DC-Fraktionen der Dichtegradientenfraktion I pro durchschnittliche Häufigkeit der Carotinoide in den DC-Fraktionen der Dichtegradientenfraktionen II und III, sowie des Ausgangsmaterials (Zellen bzw. Chloroplastenpartikel). Die Werte sind für die 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus angegeben.

photosynthetischen Aktivitäten so stellt man fest, daß diese Werte mit den Literaturangaben korrelieren: PS I-Partikel haben höhere und PS II-Partikel niedrigere Chlorophyll a/b-Verhältnisse als das Ausgangsmaterial. Vergleichbare Arbeiten mit Chloroplastenmaterial aus Chlorella (GRIMME, 1974), Dunaliella (BROWN und GASANOV, 1974) und Acetabularia (APEL et al., 1975) berichten ähnliche Korrelationen zwischen dem Chlorophyll a/b-Verhältnis und den Photosystemen. Dagegen veränderte sich bei Chlamydomonas (STEINBACK und GOODENOUGH, 1975) das Chlorophyll a/b-Verhältnis kaum.

Der Zusammenhang zwischen der Höhe des Chlorophyll a/b-Verhältnisses und der Anreicherung eines Photosystems ist in Arbeiten mit höheren Pflanzen schon früh berichtet worden (BOARDMAN und ANDERSON, 1964) und inzwischen allgemein anerkannt. Eine Ausnahme bilden die hochgereinigten PS II-Partikel, in denen das Chlorophyll a/b-Verhältnis wieder stark ansteigt (VERNON et al., 1971; WESSELS et al. 1973; KE et al., 1974) (vgl. Kap. 2.2.3.). Zur Verteilung der Carotinoide berichten BOARDMAN und ANDERSON (1967) von Spinatchloroplastenpräparationen, daß in den bevorzugte PS I - bzw. PS II-Aktivität enthaltenden Fraktionen, das Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnis 6,8 bzw. 7,0 beträgt; im 144 000 x g-Überstand beträgt es 4,1 und deutet auf gelöste Carotinoide hin. TROSPER und ALLEN (1973) berichten ebenfalls von Spinatchloroplasten Verhältnisse von 5,6 bzw. 4,9 für die angereicherten PS I- bzw. PS II-Partikel und GRIMME (1974) findet Werte von 6,1 bzw. 5,4 für PS I bzw. PS II-Partikelfraktionen aus Chlorella. In allen drei Arbeiten liegt das Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnis der Fraktionen und des Aus-

gangsmaterials zwischen 4,9 und 7,0 und es bestehen keine nennenswerten Differenzen zwischen den bevorzugt PS I- bzw. PS II-Aktivität enthaltenden Partikeln.

Vergleicht man damit die hier berichteten Ergebnisse, so fällt zunächst der hohe Carotinoid-Gehalt aller Fraktionen und des Ausgangsmaterials auf, das Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnis liegt zwischen 2,8 und 4,0, wenn man Durchschnittswerte aus den Proben der 8. und 16. Stunde bildet. Eine Besonderheit bilden die Verhältnisse in Fraktion I, die hier zurückgestellt und später ausführlich diskutiert werden sollen. Ein sinnvoller Vergleich der Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnisse in dieser Fraktion (nur PS I) ist wegen der noch zu diskutierenden Verhältnisse nicht möglich.

Betrachtet man die Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnisse in den Fraktionen II und III vergleichend zur 8. bzw. 16. Stunde des Entwicklungszyklus, dann treten allerdings starke Verschiebungen auf. Das Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnis beträgt in dem Ausgangsmaterial beider Entwicklungsstadien fast genau 3,0. Dieses Verhältnis ändert sich in den Fraktionen II und III zur 16. Stunde praktisch nicht, während es zur 8. Stunde in Fraktion II auf 2,44 absinkt und in Fraktion III auf 5,08 ansteigt.

Die Verteilung der Carotinoide in den Fraktionen ist in den Tabellen 6 bis 9 zusammengefaßt. Diese Aufschlüsselungen zeigen, daß das hohe Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnis in Fraktion I praktisch nur durch die Steigerung aller Xanthophyll-DC-Fraktionen zustande kommt, während die  $\beta$ -Carotin-DC-Fraktion etwa so groß wie die der anderen Proben ist (vgl. Tab. 5 und 7).

Diese völlig ungleichen Steigerungsraten der Carotinoidkonzentrationen in der Fraktion I können wahrscheinlich nicht auf eine spezifische Anreicherung der Xanthophylle in den PS I-Partikeln zurückgeführt werden. Dagegen spricht, daß in isolierten PS I-Partikeln (BOARDMAN und ANDERSON,, 1967, VERNON et al., 1971; GRIMME, 1974) immer die Carotin-Konzentration relativ zu den Xanthophyllkonzentrationen gesteigert ist. Im Pigmentprotein-Komplex kommt  $\beta$ -Carotin als einziges Carotinoid vor, während im Pigment-Protein-Komplex 2 (Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Protein) alle Carotinoide, bevorzugt aber Lutein und  $\beta$ -Carotin, enthalten sind (THORNER, 1975). Die gesteigerte Häufigkeit von  $\beta$ -Carotin in beiden Protein-Komplexen und den PS I-Partikeln deuten auf eine enge Bindung dieses Carotins an die beiden Reaktionszentren der Photosysteme hin. Nach der quantitativen Entfernung des  $\beta$ -Carotins mit Heptan aus den Thylakoiden ist die PS II-induzierende Reduktion von Cyt  $b_{559}$ -HP und von C 550 inhibiert, beide Reaktionen werden aber durch Zugabe von  $\beta$ -Carotin wieder rekonstituiert (OKAYAMA und BUTLER, 1972; COX und BENDALL, 1974). Beide Arbeitsgruppen diskutieren die mögliche Identität von  $\beta$ -Carotin mit der noch unbekannten Substanz, der der 520 nm Absorptionswechsel zugeordnet werden kann und die vermutlich auch dem vielgesuchten Quencher Q des PS II entspricht.  $\beta$ -Carotin wird offensichtlich durch die Digitoninbehandlung kaum aus seinen Bindungen gelöst, während Teile der Xanthophyll leichter durch Digitonin gelöst werden und sich im Saccharose-Dichtegradienten im gleichen Bereich wie die PS I-Partikel ansammeln und einen stark erhöhten Xanthophyllgehalt vertauschen. Für diese Erklärung spricht außerdem

|                   | 8. Stunde | 16. Stunde |
|-------------------|-----------|------------|
| Chlorophyll a     | 100       | 100        |
| Chlorophyll b     | 23,3      | 22,5       |
| Chlorophyll a/b   | 4,3       | 4,4        |
| Gesamtcarotinoide | 42,1      | 38,9       |
| Chl.G/Car.G       | 2,93      | 3,15       |
| <hr/>             |           |            |
| B-Carotin         | 5,85      | 5,1        |
| Lutein            | 21,3      | 19,8       |
| Uw. Lutein-Epoxid | 1,5       | 1,1        |
| Uw. Violaxanthin  | 6,8       | 6,6        |
| Neoxanthin        | 6,7       | 6,3        |

Tab. 6: Vergleich der Pigmentkonzentrationen in Zellen von *Scenedesmus obliquus* zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus. Um einen Vergleich zu erleichtern, wurden anstelle der absoluten Mengen die Werte für Chlorophyll a jeweils gleich 100 gesetzt und die Mengen der übrigen Pigmente darauf bezogen.  
 Chl.G = Summe aus Chlorophyll a + b,  
 Car.G = Summe aller Carotinoide.

|                                      | 8. Stunde | 16. Stunde |
|--------------------------------------|-----------|------------|
| Chlorophyll a                        | 100       | 100        |
| Chlorophyll b                        | 20,2      | 18,8       |
| Chlorophyll a/b                      | 5,0       | 5,3        |
| Gesamtcarotinoide                    | 149,2     | 117,7      |
| Chl. <sub>G</sub> /Car. <sub>G</sub> | 0,81      | 1,01       |
| β-Carotin                            | 6,9       | 5,6        |
| Lutein                               | 88,1      | 69,7       |
| üw. Lutein-Epoxid                    | 5,5       | 3,0        |
| üw. Violaxanthin                     | 34,2      | 22,2       |
| Neoxanthin                           | 14,5      | 17,2       |

Tab. 7 Vergleich der Pigmentkonzentrationen in der Dichtegradientenfraktion I der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Um einen Vergleich zu erleichtern, wurden anstelle der absoluten Mengen die Werte für Chlorophyll a jeweils gleich 100 gesetzt und die Mengen der übrigen Pigmente darauf bezogen. Chl.<sub>G</sub> = Summe aus Chlorophyll a + b, Car.<sub>G</sub> = Summe aller Carotinoide.

|                                      | 8. Stunde | 16. Stunde |
|--------------------------------------|-----------|------------|
| Chlorophyll a                        | 100       | 100        |
| Chlorophyll b                        | 31,1      | 29,3       |
| Chlorophyll a/b                      | 3,2       | 3,4        |
| Gesamtcarotinoide                    | 53,8      | 41,81      |
| Chl. <sub>G</sub> /Car. <sub>G</sub> | 2,44      | 3,09       |
| β-Carotin                            | 5,0       | 2,9        |
| Lutein                               | 29,5      | 25,7       |
| Üw. Lutein-Epoxid                    | 1,5       | 1,1        |
| Üw. Violaxanthin                     | 9,0       | 5,7        |
| Neoxanthin                           | 8,8       | 6,4        |

Tab. 8 Vergleich der Pigmentkonzentrationen in der Dichtegradientenfraktion II der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Um einen Vergleich zu erleichtern, wurden anstelle der absoluten Mengen die Werte für Chlorophyll a jeweils gleich 100 gesetzt und die Mengen der übrigen Pigmente darauf bezogen.  
 Chl.<sub>G</sub> = Summe aus Chlorophyll a + b  
 Car.<sub>G</sub> = Summe aller Carotinoide

|                                      | 8. Stunde | 16. Stunde |
|--------------------------------------|-----------|------------|
| Chlorophyll a                        | 100       | 100        |
| Chlorophyll b                        | 21,0      | 20,8       |
| Chlorophyll a/b                      | 4,76      | 4,81       |
| Gesamtcarotinoide                    | 23,8      | 39,8       |
| Chl. <sub>G</sub> /Car. <sub>G</sub> | 5,08      | 3,04       |
| β-Carotin                            | 5,3       | 5,8        |
| Lutein                               | 11,2      | 17,1       |
| Uw. Lutein-Epoxid                    | 0,3       | 1,8        |
| Uw. Violaxanthin                     | 3,6       | 7,5        |
| Neoxanthin                           | 3,4       | 7,6        |

Tab. 9 Vergleich der Pigmentkonzentrationen in der Dichtegradientenfraktion III der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Um einen Vergleich zu erleichtern, wurden anstelle der absoluten Mengen die Werte für Chlorophyll a jeweils gleich 100 gesetzt und die Mengen der übrigen Pigmente darauf bezogen.  
 Chl.<sub>G</sub> = Summe aus Chlorophyll a + b  
 Car.<sub>G</sub> = Summe aller Carotinoide

die Auftrennung der Chloroplastensubpartikel der Scenedesmus-Mutante C-6E, deren Bande I sich an der gleichen Stelle befindet wie die des Wildtyps, obwohl sie keinerlei Carotinoide enthält.

Eine weitere Interpretation der Carotinoid-Verteilung in den einzelnen Fraktionen ist wenig sinnvoll, daaußer Anreicherungen bestimmter Carotinoide in bestimmten Präparationen, auf die in der vorhergehenden Diskussion bereits eingegangen wurde, praktisch keine belegbare Aussage über die Rolle der Carotinoide gemacht werden kann. Für eine Diskussion vorhandener Ergebnisse und Hypothesen sei auf die Arbeit von STRÄßBERGER (1977) verwiesen, in der intensiv auf die Rolle der Carotinoide im Photosyntheseapparat eingegangen wird.

Bei der Verteilung der Carotinoide in den Zellen der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus fällt auf, daß die Konzentration jeder Carotinoid-DC-Fraktion zur 16. Stunde, bezogen auf Chlorophyll, um 7% zurückgegangen ist (Tab. 6).

Nach der Auftrennung der Chloroplastensubpartikel zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus in Dichtegradienten zeigt sich in den Fraktionen I und II das gleiche Bild, die Abnahme der DC-Carotinoidfraktionen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus beträgt sogar 80,2% bzw. 79,0%. In Fraktion III ist die Carotinoid-Konzentration dagegen um 67,1% gestiegen.

Da von der Annahme ausgegangen werden muß, daß der größte Teil der Carotinoide nicht an die PS I-Partikel gebunden ist, kann keine Aussage zur Änderung der an PS I-Partikel gebundenen Carotinoide gemacht werden. Die parallel zum Ausgangs-

material verlaufende, aber verstärkte Abnahme aller Carotinoide in der Fraktion II und die inverse Änderung in der Fraktion III verdienen dagegen Beachtung.

Der o.g. Mangel an Information über die Rolle der Carotinoide verhindert eine sinnvolle Interpretation dieser Schwankungen der Carotinoid-Verteilungen während des Entwicklungszyklus. Da alle Carotinoidkonzentrationen auf den Chlorophyllgehalt bezogen sind, wäre es allerdings auch denkbar, daß die Carotinoid-Konzentrationen konstant bleiben und sich die Chlorophyll-Konzentrationen verändern. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müßten die Konzentrationen auf einen anderen Parameter, z.B. Protein, bezogen werden. Die konstanten Chlorophyll a/b-Verhältnisse innerhalb jeder Fraktion zur 8. bzw. 16. Stunde deuten aber eher auf Schwankungen der Carotinoid-Konzentration hin (Tab. 6, 7, 8, 9).

#### 5.3.3.4. Vergleich der Absorptionsspektren und der Anregungsspektren der Fluoreszenz-emission

Von jeder der drei Fraktionen der Dichtegradienten mit Chloroplastensubpartikeln der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus sind Absorptionsspektren bei Zimmertemperatur ( $293^{\circ}\text{K}$ ) und Tieftemperatur ( $77^{\circ}\text{K}$ ) aufgenommen worden (Abb. 29 bis 34). Diese Absorptionsspektren kommen durch die Summe der Pigmente zustande, deren Konzentrationen im Kapitel 5.3.3.3. beschrieben sind. Die Funktion von Pigmenten als akzessorische Pigmente wird dagegen erst im Anregungsspektrum der Fluoreszenz sichtbar (Abb. 35 bis 38). Unter Berücksichtigung der Befunde der Pigmentanalyse sollen die Spektren diskutiert werden.

Fraktion I (Abb. 29, 32 und 35):

Bereits im Absorptionsspektrum bei Zimmertemperatur fällt die für Chloroplastenpräparationen des Wildtyps untypische Form des Spektrums in der Soret-Bande auf. Die hohe Absorption bei 458,5 nm und 486 nm im Vergleich zu der sehr geringen Absorption im Rotbereich ist auf das niedrige Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnis zurückzuführen. Das Hauptmaximum des Absorptionsspektrums befindet sich bei 458,5 nm und ist ebenso wie das Nebenmaximum bei 488 nm der Summe der Carotinoide zuzuordnen. Eine Zuordnung dieser beiden Peaks, z.B. zum Lutein als quantitativ häufigstem Carotinoid, ist nicht mit Sicherheit möglich, da die Absorption der Carotinoide in vivo noch nicht genau bekannt ist. Die stark ausgeprägte Schulter bei 438 nm ist dem Chlorophyll a zuzurechnen. Der höhere Chlorophyllgehalt zur 16. Stunde drückt sich in der Höhe der Schulter im Vergleich zum Hauptmaximum im Blaulicht und in der Absorption bei 680 nm aus. Die durch Chlorophyll b bedingte Schulter bei 658 nm ist nur sehr schwach ausgeprägt und nur im Tieftemperaturspektrum deutlich sichtbar, dies ist auf das hohe Chlorophyll a/b-Verhältnis bei insgesamt niedriger Chlorophyll-Konzentration zurückzuführen.

Das Fluoreszenzanregungsspektrum (Abb. 35) hat ein sehr hohes Maximum bei 438 nm, das dem Chlorophyll a zuzuordnen ist und ein Nebenmaximum bei 480 nm. Die gemessene Fluoreszenz stammt praktisch quantitativ von Chlorophyll a und hat ein Intensitätsmaximum zwischen 680 nm und 690 nm. Da Chlorophyll a bei Wellenlängen von über 450 nm kaum noch absorbiert, muß das Nebenmaximum durch Lichtenergie zustande kommen, die von Chlorophyll b und/oder Carotinoiden absorbiert und auf Chlorophyll a übertragen wird. Eine exakte Zu-

ordnung dieses Nebenmaximums zu Chlorophyll b oder Carotinoiden ist nicht möglich. Das breite Maximum bei ca. 477 nm mit einer breiten Schulter auf der langwelligen Seite in der 8. Stunde, verschiebt sich in der 16. Stunde des Entwicklungszyklus um ca. 3 nm zu einem ebenso breiten Maximum bei 480 nm. Da eine Verschiebung der Chlorophyll b-Absorption während des Entwicklungszyklus ausgeschlossen werden kann, ist aus dieser spektralen Veränderung auf eine Beteiligung der Carotinoide an der Energieübertragung zu schließen. Der Vergleich von Absorptions- und Fluoreszenzanregungsspektren zeigt aber klar, daß der größte Teil der Carotinoide nicht zu den akzessorischen Pigmenten gehört.

Fraktion II (Abb. 30, 33 und 36):

Chlorophyll a bestimmt das Hauptmaximum der Soret-Bande bei 438 nm und eine Absorption bei 458,5 nm, die in Fraktion I das Hauptmaximum bildete, ist nur noch im Tieftemperaturspektrum sichtbar. Das Nebenmaximum bei 486 ist wie in Fraktion I auf Carotinoide zurückzuführen.

Signifikante Unterschiede in den relativen Höhen der Peaks bzw. Schultern, zwischen den Absorptionsspektren der 8. und 16. Stunde sind nicht vorhanden. Das niedrige Chlorophyll a/b-Verhältnis dieser Fraktion drückt sich in der Schulter bzw. dem Nebenmaximum bei 658 nm im Absorptionsspektrum bei 293°K bzw. 77°K aus und ist in einem höheren Nebenmaximum des Fluoreszenzanregungsspektrums bei 480 nm ausgeprägt. Auch die Fluoreszenzspektren sind in Fraktion II zur 8. und 16. Stunde fast deckungsgleich. Die Lage der Absorptionsmaxima im Blaubereich wird zusammen mit den Maxima von Fraktion III diskutiert.

Fraktion III (Abb. 31, 34 und 37):

Die Absorptionsspektren werden in der Soret-Bande durch den Chlorophyll a-Peak bei 438 nm bestimmt und zeigen sowohl bei Zimmer- als auch bei Tieftemperatur kein ausgeprägtes Nebenmaximum. Das Absorptionsmaximum im Blaubereich befindet sich in den Tieftemperaturspektren von Fraktion II und III bei 678 nm, mit einer Schulter bei ca. 675 nm. Das Maximum und die Schulter entsprechen zwei unterschiedlichen Chlorophyll a. In den Absorptionsspektren bei Zimmertemperatur liegt das Maximum in Fraktion II bei 680 nm mit einer Schulter bei 684 nm und in Fraktion III sind das Maximum bei 684 nm und die Schulter bei 680 nm. Während also bei Zimmertemperatur die Lage der Maxima durch die beiden Chlorophyll a-Formen in Fraktion II bzw. Fraktion III verändert ist, taucht dieser Unterschied bei Tieftemperatur nicht auf. Die Fluoreszenzanregungsspektren der Fraktion III gleichen denen von Fraktion II, doch ist das Nebenmaximum bei 480 nm im Vergleich zum Hauptmaximum etwas kleiner, was evtl. auf den geringen Gehalt an Chlorophyll b zurückzuführen ist. Es bestehen keine nennenswerten Unterschiede in den Absorptionsspektren und Fluoreszenzanregungsspektren der Fraktionen II u. III aus 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus. Abb. 38 zeigt ein Tieftemperatur-Fluoreszenzanregungsspektrum der Fraktion I zur 8. bzw. zur 16. Stunde des Entwicklungszyklus. Im Vergleich zu den Fluoreszenzanregungsspektren bei Zimmertemperatur ist das Minimum bei Tieftemperatur stärker ausgeprägt und das Nebenmaximum bei 480 nm etwas stärker differenziert. Besonders der breite Abfall zum längerwelligen Bereich bei 490 nm zeigt in der Tieftemperaturprobe eine deutliche Schulter. Die geringe Verschiebung des Neben-

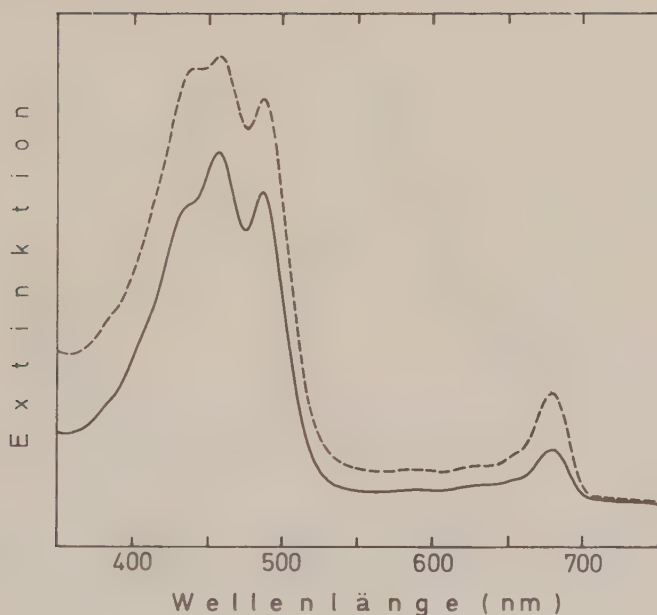


Abb. 29: Raumtemperatur-Absorptionsspektren von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion I des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus; aufgenommen bei 20° C; Zweistrahlsspektralphotometer Shimadzu MPS 5000;  
—— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

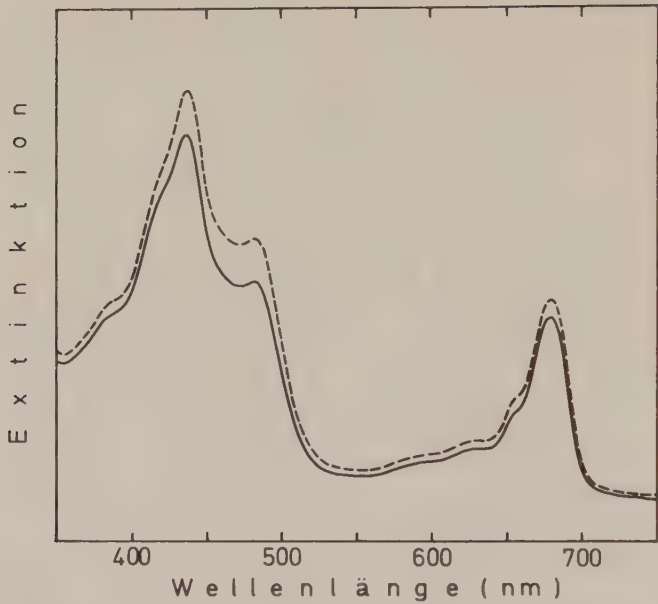


Abb. 30: Raumtemperatur-Absorptionsspektren von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion II des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus; aufgenommen bei 20° C; Zweistrahlsspektralphotometer Shimadzu MPS 5000;  
—— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

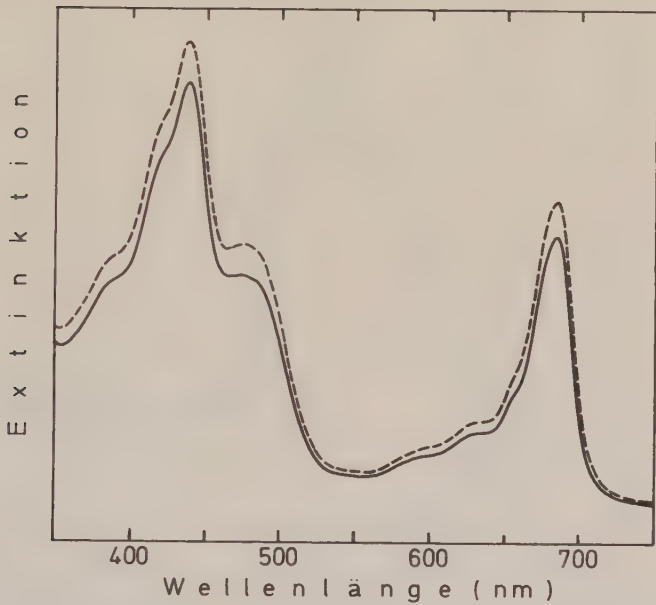


Abb. 31: Raumtemperatur-Absorptionsspektren von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion III des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus; aufgenommen bei 20° C; Zweistrahlsspektralphotometer Shimadzu MPS 5000;  
—— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

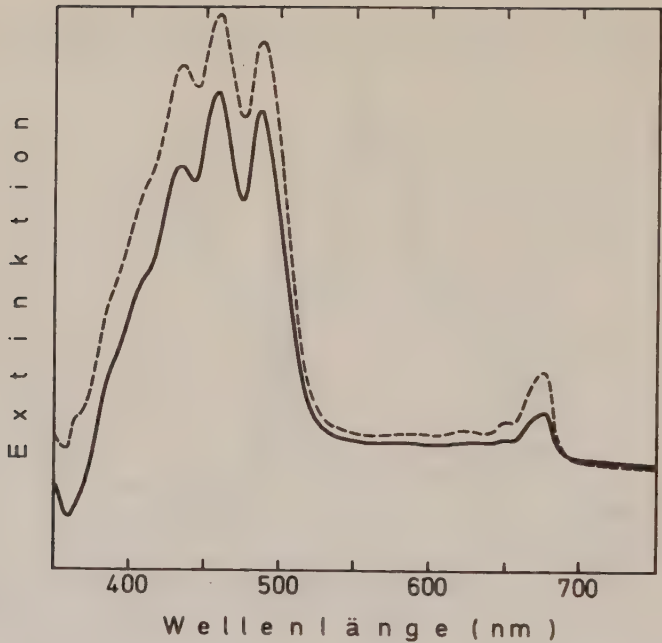


Abb. 32: Tieftemperatur-Absorptionsspektren von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion I des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus; aufgenommen in flüssigem Stickstoff bei  $77^{\circ}$  K; Zweistrahl-spektralphotometer Shimadzu MPS 50 L;  
—— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

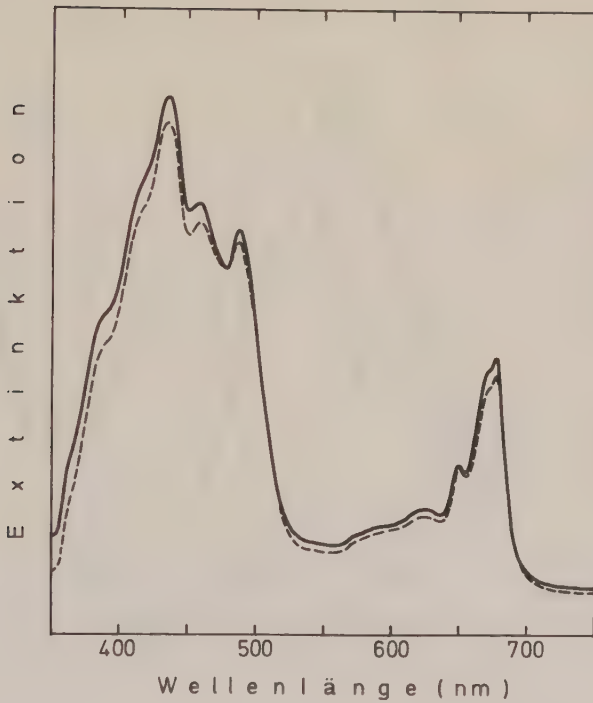


Abb. 33: Tieftemperatur-Absorptionsspektren von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion II des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus; aufgenommen in flüssigem Stickstoff bei 77° K; Zweistrahlspektralphotometer Shimadzu MPS 50 L;  
—— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

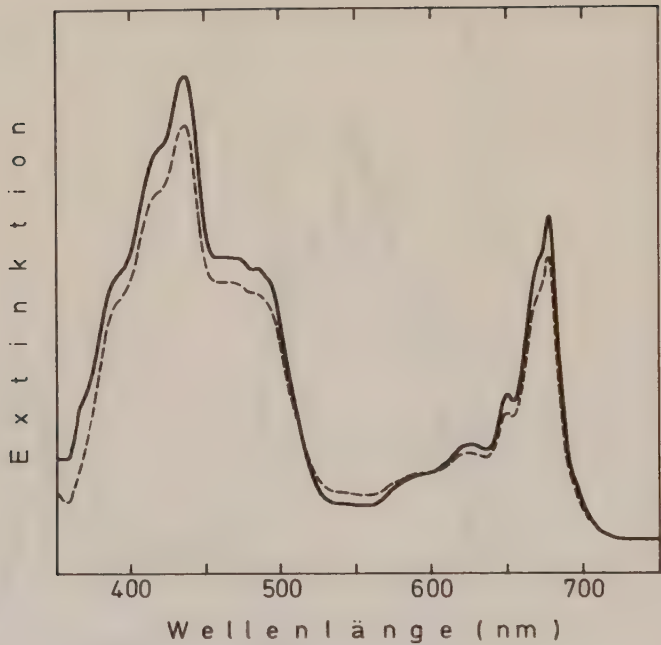


Abb. 34: Tieftemperatur-Absorptionsspektren von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion III des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus; aufgenommen in flüssigem Stickstoff bei 77° K; Zweistrahl-spektralphotometer Shimadzu MPS 50 L;  
—— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

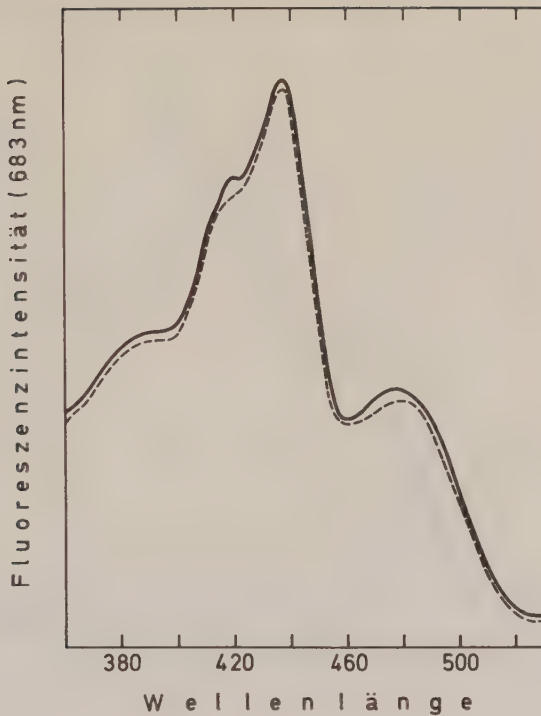


Abb. 35: Fluoreszenzanregungsspektrum von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion I des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Die Fluoreszenzemission wurde bei 683 nm  $\pm$  3,5 gemessen; Raumtemperatur; Shimadzu Spektralfluorometer RF-502;  
———— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

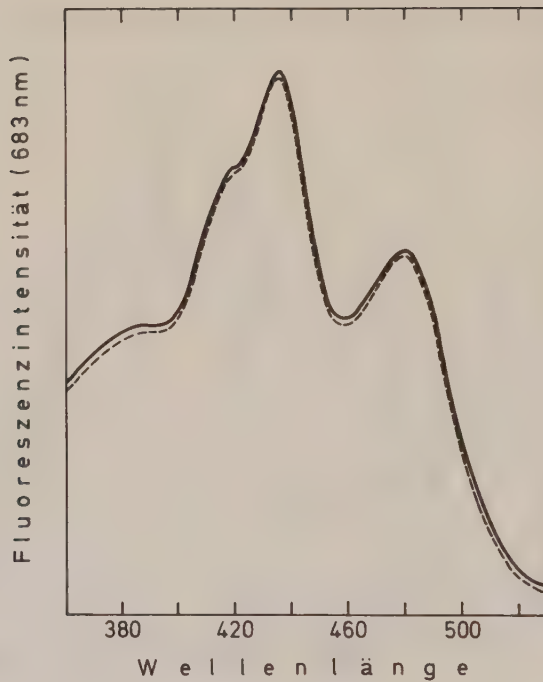


Abb. 36: Fluoreszenzanregungsspektrum von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion II des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Die Fluoreszenzemission wurde bei  $683 \text{ nm} \pm 3,5$  gemessen; Raumtemperatur; Shimadzu Spektralfluorometer RF-502;  
—— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

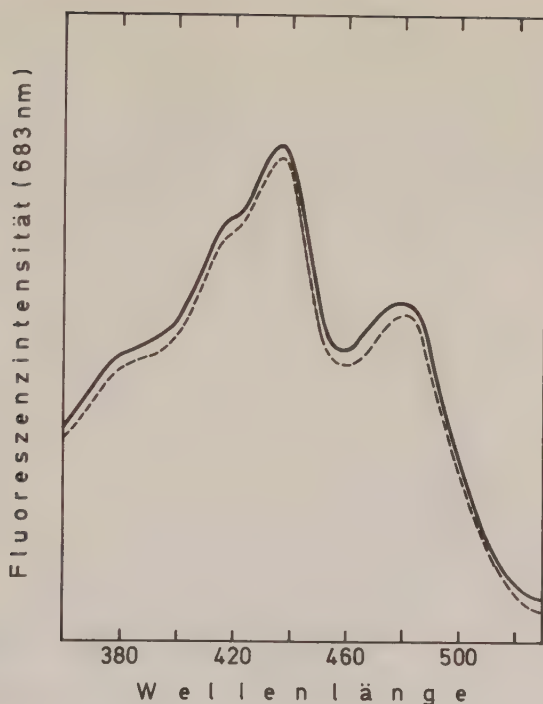


Abb. 37: Fluoreszenzanregungsspektrum von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion III des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Die Fluoreszenzemission wurde bei 683 nm  $\pm$  3,5 gemessen; Raumtemperatur; Shimadzu Spektralfluorometer RF-502;  
———— = 8. Stunde, ----- = 16. Stunde

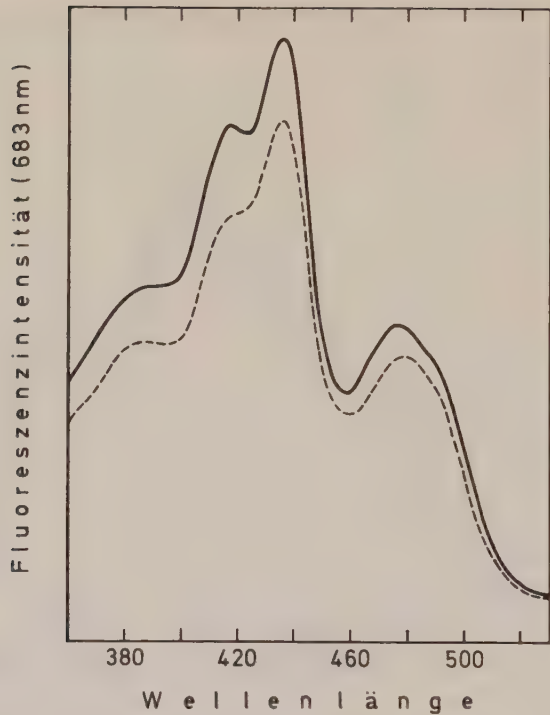


Abb. 38: Tieftemperatur-Fluoreszenzspektrum von Chloroplastensubpartikeln der Fraktion I des Saccharose-Dichtegradienten von Synchronkulturen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. Die Fluoreszenzemission wurde bei  $683 \text{ nm} \pm 3,5$  gemessen; aufgenommen in flüssigem Stickstoff bei  $77^\circ \text{ K}$ ; Shimadzu Spektralfluorometer RF-502;

———— = 8. Stunde,      - - - - - = 16. Stunde

maximums um ca. 3 nm zum langwelligen Bereich (Abb.35) in der 16. Stunde des Entwicklungszyklus bleibt auch bei Tieftemperatur erhalten. Als weiterer Unterschied fällt auf, daß die Schulter bzw. das Nebenmaximum bei 420 nm zur 8. Stunde stärker ausgeprägt ist, dies war auch in den Zimmertemperatur-Fluoreszenzanregungsspektren der anderen Fraktionen der Fall, kann aber nicht gedeutet werden.

## 6. Schlußfolgerungen

Chloroplastenpartikel aus Scenedesmus obliquus können durch die Homogenisierung der Algen mit Glasperlen in einer Glasperlenmühle gewonnen werden (SENGER und MELL, 1976). Hohe Aktivitäten der Chloroplastenpartikel in den photosynthetischen Teilreaktionen werden durch Homogenisieren der Zellen und der Messung der Reaktionen bei pH 7,5 erreicht. Im Medium I, das einen Tricine/KOH-Puffer enthält, sind die Aktivitäten der Hill-Reaktionen durchschnittlich 20% höher, die PS I-Aktivitäten aber sehr viel niedriger als im Medium II, das auf einem Sörensenpuffer basiert. Zur Vereinheitlichung der Methode wurden alle weiteren Messungen mit Medium II vorgenommen. Vergleiche mit anderen Präparationen von Chloroplasten bzw. Chloroplastenpartikeln aus Algen oder höheren Pflanzen zeigen, daß die Sauerstoffentwicklung bzw. die Entfärbung von DCPIP durch die Hill-Reaktion mit über 200  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$ , bzw. 500  $\mu\text{mol red. DCPIP}/\text{mg Chl} \times \text{h}$ , der hier beschriebenen Chloroplastenpartikel aus Scenedesmus mit zu den höchsten Werten gehören. Das gleiche gilt für die PS I-Aktivität, die als Sauerstoffaufnahme gemessen wurde und bei der Werte bis zu 1200  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl} \times \text{h}$  erreicht wurden.

Die Präparation der Chloroplastenpartikel mit den Glasperlen scheint die beiden Photosysteme kaum zu schädigen, auch wenn länger als notwendig, also über fünf Minuten hinaus, homogenisiert wurde.

Die Haltbarkeit der Chloroplastenpartikel im Medium II ist bei 0°C sehr gut. In einem Zeitraum bis zu sechs Stunden traten keine starken

Aktivitätsverluste in den beiden Teilreaktionen der Photosynthese ein.

Der Anspruch der Scenedesmus-Chloroplastenpartikel an die Konzentration der Hill-Reagenzien ist bei DCPIP und pBQ vergleichbar mit den von Chloroplasten höherer Pflanzen, bei Kaliumhexacyanoferrat (III) ist die optimale Konzentration für eine hohe Hill-Reaktion jedoch fast um den Faktor 100 höher.

FRICKEL-FAULSTICH und SENGER (1972) finden unterschiedliche DCMU-Empfindlichkeiten in Zellen von Scenedesmus obliquus zu verschiedenen Entwicklungsstadien. In Versuchen mit Chloroplastenpartikeln (FRICKEL-FAULSTICH, 1974) treten diese Unterschiede nicht mehr auf und sind daher wohl auf die unterschiedliche Permeabilität der Zellwand für den Hemmstoff zurückzuführen. Durch die Verwendung der hier beschriebenen Chloroplastenpartikelpräparation können derartige Permeationsschwierigkeiten beim Einsatz von Hemmstoffen (SENGER, 1977), Elektronendonoren und Elektronenakzeptoren in Zukunft umgangen werden.

Die Schwankungen der Photosynthesekapazität während des Entwicklungszyklus synchronisierter Kulturen von Scenedesmus obliquus ist auch in den photosynthetischen Teilreaktionen der Chloroplastenpartikel nachweisbar. Wie in Chloroplastenpartikeln, die aus Synchronkulturen von Chlamydomonas (SCHOR et al., 1970), Chlorella (NELLE et al., 1975) oder Bumilleriopsis (HESSE et al., 1976, 1977) isoliert werden, weisen auch die Zellen von Scenedesmus Aktivitätsschwankungen in der Hill-Reaktion und der PS I-Reaktion auf. Dies widerspricht den Befunden von SENGER (Zusammenfassung 1975) an ganzen Zellen von Scenedesmus obliquus, die belegen, daß nur die Hill-Reaktion, nicht aber die PS I-Reaktion in ihrer Aktivität während der Zellentwicklung schwankt.

Das Chlorophyll/P-700-Verhältnis wurde aus chemisch induzierten Differenzspektren bestimmt und ist für Chloroplastenpartikel zur 8. und 16. Stunde fast genau 500. Nimmt man eine Umverteilung der Antennenpigmente während des Entwicklungszyklus an, so deutet dies auf eine konstante Größe von PS I und PS II und somit der Photosynthese-Einheiten hin. MYERS und GRAHAM (1975) erhalten für Synchronkulturen von Scenedesmus obliquus ähnliche Werte. Das konstante Chlorophyll/P-700-Verhältnis schließt aber unterschiedliche Aktivitäten der Reaktionen um PS I nicht aus und die sich widersprechenden Befunde zwischen ganzen Zellen und Chloroplastenpartikeln können durch diese Ergebnisse allein nicht erklärt werden.

Da eine Lösung dieser Widersprüche durch weitere Experimente mit diesen beiden Systemen nicht möglich schien, wurden die für Chloroplasten höherer Pflanzen entwickelten Methoden der Isolation bzw. Anreicherung der Photosynthese auf die Chloroplastenpartikel der Grünalge Scenedesmus übertragen.

Die Desintegration der Chloroplastenpartikel in Chloroplastensubpartikel unterschiedlichen spezifischen Gewichtes zeigte mit Digitonin die besten Ergebnisse. Die Auftrennung in einem Saccharose-Dichtegradienten (10% - 66% w/w) der mit Digitonin behandelten Chloroplastenpartikel ergibt drei unterschiedlich schwere Subpartikelfraktionen, deren spezifisches Gewicht dem von ca. 15%iger und 46%iger Saccharoselösung (w/w) entspricht.

Aktivitätsmessungen zeigten, daß die spezifisch leichteste Fraktion I nur PS I-aktive Partikel enthält, da nur PS I-Aktivität nachweisbar war, aber keinerlei PS II-Aktivität. Die mittlere

Fraktion II enthielt Partikel, die eine relativ geringe PS I-Aktivität besaßen, aber eine deutliche PS II-Reaktion zeigten. Das wasserspaltende System war jedoch inaktiv und mußte durch DPC als Elektronendonator ersetzt werden. Die Subpartikel der schwersten Fraktion, Fraktion III, besaßen noch Aktivitäten in der Hill-Reaktion und geringe Aktivitäten in der PS I-Reaktion.

Die veränderten Chlorophyll a/b-Verhältnisse in den Fraktionen stimmen in der Tendenz mit den Literaturangaben überein, d.h. daß es in isolierten PS I-Partikeln (Fraktion I = 5) höher und in angereicherten PS II-Partikeln (Fraktion II = 3) niedriger als im Ausgangsmaterial (4,3) ist. Fraktion III hat ein schwach erhöhtes Chlorophyll a/b-Verhältnis von 4,7.

Die Ergebnisse der Carotinoid-Bestimmungen in den Fraktionen können nur bedingt mit der vorliegenden Literatur verglichen werden, da die Fraktion I eine untypisch hohe Carotinoid-Konzentration hat, die vermutlich durch die leichte Digitoninlöslichkeit der Xanthophylle vorgetäuscht wird. Das Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnis beträgt in allen untersuchten Chloroplastenmaterialien von Scenedesmus obliquus etwa den Wert 3 und ist damit halb so groß wie in den Literaturangaben für Spinat (BOARDMAN und ANDERSON, 196 ) oder Chlorella (GRIMME, 1974). Die Möglichkeit, daß die Fraktion "gelöste" Carotinoide enthalten, wird von den Autoren nicht diskutiert. Die Digitoninbehandlung der Chloroplastenpartikel von Scenedesmus und die anschließende Auftrennung der Subpartikel resultiert in einer Auftrennung des Photosyntheseapparates in PS I-Partikel (Fraktion I), einer relativen Anreicherung von PS II bzw. Verarmung von PS I (Fraktion II) und einer dritten, insgesamt wenig aktiven Fraktion III,

die keinem der Photosysteme näher zugeordnet werden kann und die evtl. aus größeren Aggregationen besteht. die viele Light-Harvesting-Chlorophyll a/b-Proteine und auch noch Carotinoide enthalten (THORNEER,1975). Das relativ hohe Chlorophyll a/b-Verhältnis von 4,7 macht aber auch diese Zuordnung der Fraktion III fraglich und es wären weitere Experimente nötig, in der diese Fraktion z.B. durch SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese auf ihre Pigment-Protein-Komplexe untersucht wird.

Der Vergleich der Dichtegradienten-Fractionen von Chloroplastenpartikelpräparationen aus der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus ist aber trotz der Schwierigkeiten bei der Zuordnung von Fraktion III möglich. Die Kapazitätsschwankungen der Hill-Reaktionen (PS II) in Zellen und in Chloroplastenpartikeln der 8. und 16. Stunde bleiben auch in den isolierten Chloroplastensubpartikeln erhalten. Bei der Hill-Aktivität der Fraktion III sind ebenso die Schwankungen nachweisbar, wie in der DPC-ab-hängigen Reduktion von DCPIP durch PS II in Fraktion II und Fraktion III. Diese Versuche beweisen, daß die Aktivitätsänderungen mit Sicherheit nicht im wasserspaltenden System begründet sind, sondern durch PS II selbst oder kurz danach, also durch den Quencher Q oder durch PQ zustande kommen können. Aufgrund von Fluoreszenzinduktionsmessungen (Kautsky-Effekt) und der variierenden Hemmwirkung von DBMIB zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus hatte FRICKEL-FAULSTICH (1974) dem Plastochinon eine entscheidende Rolle als begrenzenden Faktor des Elektronentransportes zugesprochen. Dieses Arbeitsmodell behält auch nach diesen Experimenten mit Chloroplastensubpartikeln noch seine Gültigkeit. Die Reduktion von DCPIP durch PS II

bedingt einen Elektronenfluß durch das PQ, wie die Hemmstoff-Versuche mit DBMIB beweisen (FRICKEL-FAULSTICH, 1974). Es ist somit zu schließen, daß die isolierten PS II-Partikel noch das PQ enthalten. Eine Überprüfung dieses Schlusses könnte die Messung der Hill-Aktivität von Subpartikeln nach der Extraktion des PQ sein (BISHOP, 1959). Die Hemmung der Hill-Reaktion oder die Unterdrückung der Aktivitätsschwankungen der Hill-Reaktion durch Extraktion des PQ und Rekonstitution der Reaktion bzw. der Schwankungen bei erneuter Zugabe von PQ wären ein letzter Beweis für die Gültigkeit dieses Arbeitsmodells.

Die Aktivitätsänderungen in der PS I-Reaktion von Chloroplastenpartikeln während des Entwicklungszyklus, die an mehreren Algenspezies in verschiedenen Labors gefunden wurden und auch bei den Chloroplastenpartikeln aus Scenedesmus in dieser Arbeit beschrieben werden, standen im Gegensatz zu den Messungen an ganzen Zellen (SENGER, 1975). Die isolierten PS I-Partikel in Fraktion I zeigen in ihren Aktivitäten keine Unterschiede zwischen der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus. Die Kinetik der PS I-Reaktion mit Asc./DAD bzw. Asc./DCPIP von Chloroplastenpartikeln bei zunehmender Aufbruchsdauer (Kap. 5.1.3.) und die Wirkung von Digitonin (ROBINSON und WISKICH, 1975) auf die gleichen Reaktionen, die an den isolierten PS I-Partikeln gemessen wurden (Asc./DCPIP aktiver als Asc./DAD), lassen den Schluß zu, daß die Reduktion von P-700 mit DCPIP nicht von Plastocyanin abhängig ist. Die Möglichkeit der Reduktion von P-700 über das Cytochrom f bleibt offen, da die Sequenz Plastocyanin  $\rightarrow$  Cytochrom f  $\rightarrow$  P-700 in der Elektronentransportkette durchaus diskutiert wird (NELSON,

1976). Wenn MV in beiden Systemen die Elektronen an der gleichen Stelle abnimmt, und es spricht nichts dagegen, dann müssen bei Chloroplastenpartikeln zwischen der Donorstelle von DCPIP und der Akzeptorstelle von MV Veränderungen auftreten, die in Chloroplastenpartikeln die Aktivitätsschwankungen in Präparationen zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus verursachen und die durch die Digitoninwirkung wieder aufgehoben werden.

Postuliert man, daß Cytochrom f zwischen Plastocyanin und P-700 lokalisiert ist, dann könnten Veränderungen an Cytochrom f in Chloroplastenpartikeln für die Aktivitätsschwankungen der PS I-Reaktionen während des Entwicklungszyklus verantwortlich sein. Diese Hypothese könnte auch die Messungen von SCHOR et al. (1970) an Chlamydomonas, NELLE et al. (1975) and Chlorella und HESSE et al. (1976, 1977) an Bumilleriopsis erklären (vgl. Kap. 2.1.4.). Diese postulierten Veränderungen von Cytochrom f werden durch die Wirkung von Digitonin in den Subpartikeln, z.B. durch Herauslösung des Cytochrom f aufgehoben und die gemessenen PS I-Aktivitäten sind zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus gleich. Welcher Art diese Änderungen am Cytochrom f sind, die die Aktivitätsänderungen in den PS I-Reaktionen von Chloroplastenpartikeln verursachen, bleibt vorerst ungeklärt. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Konstanz der Aktivität von PS I i.e. S. über den Entwicklungszyklus ganzer Zellen an isolierten PS I-Partikeln bestätigt werden kann.

Aus den Pigmentanalysen bleibt festzuhalten, daß die Chlorophyll : Carotinoid-Verhältnisse zur 8. Stunde in den Fraktionen II und III gegenüber dem Ausgangsmaterial verändert sind, zur 16. Stunde

dagegen in allen Fraktionen konstant bleiben. Die Kontrolle der einzelnen Carotinoide zeigt, daß diese Veränderungen zur 8. Stunde für alle DC-Fraktionen der Carotinoide zutrifft. Zur Fraktion I, also den PS I-Partikeln, kann keine sinnvolle Aussage gemacht werden, da evtl. Änderungen durch die gelösten Carotinoide in dieser Bande überdeckt werden. Der so begründete hohe Carotinoidgehalt wird in den Absorptionsspektren bei Raum- und Tieftemperatur besonders deutlich. Das Anregungsspektrum der Fluoreszenz zeigt aber, daß der größte Teil der Carotinoide nicht als akzessorische Pigmente wirken, denn das Spektrum könnte fast vollständig durch vorhandene Chlorophylle entstehen. Geringe Veränderungen des Nebenmaximums bei 480 nm deuten aber auch auf die viel diskutierte Beteiligung von Carotinoiden in der Energieübertragung im PS I hin. In den Absorptionsspektren bzw. Fluoreszenzanregungsspektren der Fraktionen I, II und III kommt in der relativen Höhe der Schultern bei 658 nm bzw. der Nebenmaxima bei 480 nm das unterschiedliche Chlorophyll a/b-Verhältnis zum Ausdruck. Aufschlußreiche Unterschiede zwischen den Spektren der Fraktionen der 8. bzw. 16. Stunde des Entwicklungszyklus sind jedoch nicht sichtbar.

## 7. Zusammenfassung

Die in den vorausgehenden Arbeiten (MELL, 1974; SENGGER und MELL, 1976) ausgearbeitete Standardisierung der Präparation von Chloroplastenpartikeln aus Zellen synchroner Kulturen von Scenedesmus obliquus wurde hinsichtlich der Aktivität der Chloroplastenpartikel in den Hill-Reaktionen und den PS I-Reaktionen optimiert. Dabei wurden Raten erzielt, die an der oberen Grenze der in der Literatur berichteten Werte liegen. Die Messung der beiden Teilreaktionen der Photosynthese über den Entwicklungszyklus mit den so präparierten Chloroplastenpartikeln verlaufen parallel zu den Kapazitätsschwankungen der Photosynthese ganzer Zellen. Für die Hill-Reaktion werden damit die Befunde aus Messungen mit den intakten Zellen bestätigt, für den Bereich der PS I-Aktivität treten aber Widersprüche auf, da die PS I-Aktivität intakter Zellen über den Entwicklungszyklus konstant bleibt.

Zur weiteren Behandlung dieser Frage wurden die Methoden der Desintegration der Chloroplastenthylakoide mit Digitonin und der anschließenden Isolation bzw. Anreicherung der Photosysteme im Saccharose-Dichtegradienten auf die vorliegenden Chloroplastenpartikel aus Scenedesmus obliquus übertragen und zur vergleichenden Untersuchung der Stadien aus der 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus angewandt.

Aus den Dichtegradienten konnten jeweils drei Fraktionen zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus isoliert werden. Die leichteste Fraktion enthielt PS I-Partikel und eine große Menge vermutlich ungebundener Carotinoide. Die mittlere Fraktion enthielt angereicherte PS II-Partikel. Die schwere Fraktion hatte noch ein aktives, was-

serspaltendes System und zeigte insgesamt geringe PS II-Aktivität und geringe PS I-Aktivität. Eine genaue Zuordnung der Fraktion II zu einer bestimmten Chloroplastenthylakoidstruktur konnte nicht vorgenommen werden.

Die PS I-Partikel in Fraktion I zeigten zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus gleiche Aktivitäten, während die angereicherten PS II-Partikel in den Fraktionen II und III in der Hill-Reaktion ähnliche Unterschiede in der Hill-Reaktion aufweisen wie ganze Zellen der entsprechenden Entwicklungsstadien.

Fluoreszenzanregungsspektren der Fraktion I bei Raum- und Tieftemperatur zeigten, daß der hohe Carotinoidgehalt keinen Einfluß auf den Anteil der Carotinoide als akzessorische Pigmente hat, Differenzen zwischen den Spektren der 8. und 16. Stunde zeigten aber auch, daß einige Carotinoide an der Energieübertragung auf das Chlorophyll a im PS I beteiligt sind.

Änderungen der Absorption und der Fluoreszenzanregung in den Spektren der drei Fraktionen zur 8. bzw. 16. Stunde des Entwicklungszyklus traten nicht auf.

Das Chlorophyll/P-700-Verhältnis ist in den Chloroplastenpartikeln zur 8. und 16. Stunde des Entwicklungszyklus gleich und deutet auf die konstante Größe der Photosynthese-Einheit von Scenedesmus obliquus hin.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AITZETMÜLLER, K., STRAIN, H.H., SVEC, W.A.,  
GRANDOLFO, M., KATZ, J.J.:  
Loroxanthin, a unique xanthophyll from  
*Scenedesmus obliquus* and *Chorella vulgaris*  
Phytochem. 8, 1761-1770 (1969)

ANDERSON, J.M.:  
The molecular organization of chloroplast  
thylakoids  
Biochim. Biophys. Acta 416, 191-235 (1975)

ANDERSON, J.M. and BOARDMAN, N.K.:  
Fractionation of the photochemical systems of  
photosynthesis. I. Chlorophyll contents and  
photochemical activities of particles isolated  
from spinach chloroplasts  
Biochim. Biophys. Acta 112, 403-421 (1966)

ANDERSON, J.M. and LEVINE, R.P.:  
Membrane polypeptides of some higher plant  
chloroplasts  
Biochim. Biophys. Acta 333, 378-387 (1974) a

ANDERSON, J.M. and LEVINE, R.P.:  
The relationship between chlorophyll-protein  
complexes and chloroplast membrane polypeptides  
Biochim. Biophys. Acta 357, 118-126 (1974) b

APEL, K., BOGORAD, L. and WOODCOCK, C.L.F.:  
Chloroplast membranes of the green alga  
*Acetabularia mediterranea*. I. Isolation of the  
PS II  
Biochim. Biophys. Acta 387, 568-579 (1975)

ARNTZEN, C.J., DILLEY, R.A., PETERS, G.A.,  
SHAW, E.R.:

Photochemical activity and structural studies  
of photosystems derived from chloroplast  
grana and stroma lamellae

Biochim. Biophys. Acta 256, 85-107 (1972)

ARNTZEN, C.J. and BRIANTAIS, J.M.:

Chloroplast structure and function

In: Bioenergetics of Photosynthesis, Govindjee  
ed. Academic Press, New York 1975, 52-115

ARNTZEN, C.J., DILLEY, R.A. and NEUMANN, J.:

Localization of photophosphorylation and  
proton transport activities in various regions  
of the chloroplast lamellae

Biochim. Biophys. Acta 245, 409-424 (1971)

ARNTZEN, C.J., DILLEY, R.A. and CRANE, F.L.:

A comparison of chloroplast membrane surfaces  
visualized by freeze-etch and negative staining  
techniques and ultrastructural characterization  
of membrane fractions obtained from digitonin-  
treated spinach chloroplasts

J. Cell. Biol. 43, 16-31 (1969)

BAUER, R.:

Die Photomorphogenese des photosynthetischen  
Apparates grüner Pflanzen, untersucht mit Hilfe  
des Kautsky-Effektes

Dissertation an der Technischen Hochschule Aachen  
1972

BENDALL, D.S., DAVENPORT, H.E. and HILL, R.:

Cytochrome components in chloroplasts of the  
higher plants

In: Methods in Enzymology, XXIII, A. San Pietro ed.,  
Academic Press, New York 1971, 327-343

BERGER, C.:

Aktivitätsänderungen einiger Enzyme synchronisierter Chlorella Zellen im Licht-Dunkel-Wechsel  
I. Veränderungen während des Entwicklungszyklus  
Flora 157, 211-232 (1966)

BERZBORN, R. J. and BISHOP, N.J.:

Isolation and properties of chloroplast particles of *Scenedesmus obliquus* D<sub>3</sub> with high photochemical activity  
Biochim. Biophys. Acta 292, 700-714 (1973)

BISHOP, N.J.:

The reactivity of a naturally occurring quinone (Q-255) in photochemical reactions of isolated chloroplasts  
Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 1696-1702 (1959)

BISHOP, N.J. and SENGEL, H.:

Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*  
Methods in Enzymology XXIII, Photosynthesis 53-66, A. San Pietro ed., Academic Press, New York 1971

BJÖRKMANN, O.:

Comparative studies on photosynthesis in higher plants  
In: Photophysiology, Giese, A.C. ed., Academic Press, New York (1971), 1-66

BOARDMAN, N.K.:

Physical preparation of the photosynthetic photochemical systems  
Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 115-140 (1970)

BOARDMAN, N.K. and ANDERSON, J.M.:

Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis II. Cytochrome and carotinoid contents of particle isolated from spinach chloroplasts

Biochim. Biophys. Acta 143, 187-203 (1967)

BOARDMAN, N.K. and ANDERSON, J.M.:

Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll a and chlorophyll b and their possible role in the light reactions of photosynthesis

Nature 203, 166-167 (1964)

BOARDMAN, N.K., THORNE, S.W. and ANDERSON, J.M.:

Fluorescence properties of particles obtained by digitonin fragmentation of spinach chloroplasts

Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 56, 586-593 (1966)

BRANTON, D. and PARK, R.P.:

Subunits in chloroplast lamellae

J. Ultrastruct. Res. 19, 283-303 (1967)

BRAND, J.J., CURTIS, V.A.:

Partial reactions of photosynthesis in briefly sonicated Chlamydomonas chloroplast. II. Photophosphorylation actives

Plant Physiol. 55, 187-191 (1975)

BROWN, J. S.:

Separation of photosynthetic systems I and II  
In: Photophysiology, A.C. Giese ed., Academic Press, New York 1973, 97-112

BROWN, J.S. and GASANOV, R.A.:

Photosynthetic activity and chlorophyll  
absorption spectra of fractions from the alga  
*Dunaliella*

Photochem. Photobiol. 19, 139-146 (1974)

CATTOLICO, R.A., BOOTHROYD, J.C. and GIBBS, S.P.:

Synchronous growth and plastid replication in the  
naturally wall-less alga *Olisthodiscus luteus*

Plant Physiol. 57, 497-503 (1976)

COX, R.P. and BENDALL, D.S.:

The function of plastoquinone and  $\beta$ -carotene  
in photosystem II of chloroplasts

Biochim. Biophys. Acta 347, 49-59 (1974)

CURTIS, V.A., BRAND, J.J. and TOGASAKI, R.K.:

Partial reactions of photosynthesis in briefly  
sonicated *Chlamydomonas* chloroplast. I. Cell  
breakage and electron transport activities

Plant Physiol. 55, 183-186 (1975)

DAS, G.

Changes in chloroplast structure during auto-  
spore formation in *Scenedesmus obtusiusculus*

Protoplasma 84, 175-180 (1975)

DAVIES, B.H.:

Carotenoids

In: Chem. and Biochem. of Plant Pigments;

Goodwin ed. Vol.II, Acad. Press, New York 1976,

38

DÖHLER, G

Photosynthetische Carboxylierungsreaktionen  
synchron kultivierter *Chlorella vulgaris*

Z. Pflanzenphysiol. 73, 283-295 (1974)

ESTABROOK, R.W.:

Mitochondrial respiratory-control and the  
polarographic measurement of ADP : O<sub>2</sub> ratios  
In: Methods in Enzymology, X, Oxidation and  
Phosphorylation, Colowick and Kaplan ed.,  
New York 1967, 41-47

FELLER, W.:

Enzymatische Ribonucleotid-Reduktion in der  
Grünalge *Scenedesmus obliquus*  
Diplomarbeit, Universität Marburg (1975)

FLEISCHHACKER, P.:

Änderungen im Photosynthesemechanismus bei An-  
zucht homokontinuierlicher Kulturen von *Scenedes-*  
*mus obliquus* in Stark- und Schwachlicht  
Dissertation, Marburg 1975

FORK, D.C.:

Oxygen electrode

In: Methods in Enzymology, XXIV; Photosynthesis  
and Nitrogen Fixation, Part B, 113-123 (1972)  
A. San Pietro ed., Academic Press, New York 1972

FRANCIS, G.W., STRAND, L.P., LIEN, T.U.,  
KNUTSEN, G.:

Variations in the carotenoid content of *Chlamydo-*  
*monas reinhardtii* throughout the cell cycle  
Arch. Microbiol. 104, 249-254 (1975)

FRICKEL-FAULSTICH, B.:

Veränderungen im photosynthetischen Elektronen-  
transport einzelliger Grünalgen während des  
Entwicklungszyklus  
Dissertation, Universität Marburg 1974

FRICKEL-FAULSTICH, B. und SENGER, H.:

Änderung der DCMU-Empfindlichkeit während  
des Entwicklungszyklus von *Scenedesmus*  
*obliquus*

Ber. Deut. Bot. Ges. 85, 401-408 (1972)

FRICKEL-FAULSTICH, B. und SENGER, H.:

Regulation des photosynthetischen Elektronen-  
transports zwischen Photosystem II und Photo-  
system I

Ber. Deut. Bot. Ges. 87, 443-456 (1974)

GAFFRON, H.:

Carbon dioxide reduction with molecular hydrogen  
in green algae

Am. J. Bot. 27, 273-283 (1940)

GAFFRON, H.:

The reduction of carbon dioxide with molecular  
hydrogen in green plants

Nature 143, 204-205 (1939)

GAFFRON, H.:

Alteration in size of the photosynthetic unit  
during development

Workshop-Marburg (1975);

GARNIER, J. and MAROC, J.:

Studies of the electron transport chain of three  
non-photosynthetic mutants of *Chlamydomonas*  
*reinhardtii*

Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971 pp.

Reprint 1, 669-675 (1972)

GAZANCHYAN, R.M., ABILOR, Z.K., ALIEV, Z.S.,  
GASANOV, R.A.:

Photochemical activities of photosystem I  
and II from grana and photosystem I from  
stroma lamellae isolated in different ways  
*Photosynthetica* 2 268-276 (1975)

GENGE, S., PILGER, D. and HILLER, R.G.  
The relationship between chlorophyll b and  
pigmentprotein complex II  
*Biochim. Biophys. Acta* 347, 22-30 (1974)

GOODENOUGH, U.W. and STAEHELIN, L.A.:  
Structural differences of stacked and unstacked  
chloroplast membranes. Freeze-etch electron  
microscopy of wild-type and mutant strains  
of *Chlamydomonas*  
*J. Cell. Biol.* 48, 594-619 (1971)

GOOD, N.E. and IZAWA, S.:  
Hydrogen ion buffers  
In: *Methods in Enzymology* XXIII, Photosynthesis  
and Nitrogen Fixation, Part B, 53-68 (1971)  
A. San Pietro ed., Acad. Press, New York

GOODCHILD, D.J. and PARK, R. B.:  
Further evidence for stroma lamellae as a  
source of photosystem I fractions from spinach  
chloroplasts  
*Biochim. Biophys. Acta* 226, 393-399 (1971)

GOULD, J.M. and IZAWA, S.:  
Photosystem II electron transport and phosphory-  
lation with dibromothymoquinone as the electron  
acceptor  
*Eur. J. Biochem.* 27, 185-192 (1973)

GRIMME, L.H.:

Die Carotinoid-Zusammensetzung von PS I und PS II Chlorella-Subchloroplastenpartikeln  
Ber. Deut. Bot. Ges. 87, 509-514 (1974)

GRIMME, L.H. and BOARDMAN, N.K.:

Separation of Photosynthetic System I and II from a chloroplast preparation from Chlorella  
Hoppe Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 354, 1499-1502 (1973)

GRIMME, L.H. and BOARDMAN, N.K.:

Photochemical activities of a particle fraction P<sub>1</sub> obtained from the green alga Chlorella fusca  
Bloch. and Biophy. Res. Com. 49, 1617-1623 (1972)

HAGER, A. und MEYER-BERTENRATH, T.:

Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünn-schichtchromatographischer Methoden  
Planta (Berl.) 69, 198-217 (1966)

HAGER, A. und MEYER-BERTENRATH, T.:

Die Identifizierung der an Dünnschichten getrennten Carotinoide grüner Blätter und Algen  
Planta (Berl.) 76, 149-168 (1967 a)

HAGER, A. und MEYER-BERTENRATH, T.:

Beziehungen zwischen Absorptionsspektrum und Konstitution bei Carotinoiden von Algen und Höheren Pflanzen  
Ber. Deut. Bot. Ges. 80/7, 426-436 (1967 b)

HAGER, A. und STRANSKY, H.:

Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllzyklus in verschiedenen Algenklassen. I. Methoden zur Identifizierung der Pigmente  
Arch. Mikrobiol. 71, 132-163 (1970)

HAEHNEL, W.:

The ratio of the two light reactions and their coupling in chloroplasts

Biochim. Biophys. Acta 423, 499-509 (1976)

HALL, D.O., EDGE, H., REEVES, S.G., STOCKING, C.R.  
and KALINA, M.:

The site of ferricyanide photoreduction in the lamellae of isolated spinach and maize chloroplasts: a cytochemical study

Proc. Int. Congr. Photosyn. Res., 2nd, 1971,  
Vol 1 (1972), 701-721

HESSE, M.:

Wachstum und Synchronisierung der Alge

Bumilleriopsis filiformis Vischer (Xanthophyceae)

Planta 120, 135-146 (1974)

HESSE, M., BLEY, P., BÖGER, P.:

Photosynthetischer Elektronentransport der Alge

Bumilleriopsis während der Zellentwicklung

Planta 132, 53-60 (1976)

HESSE, M., KULANDAIVELU, G. and BÖGER, P.:

Characterization of synchronized cultures of

Bumilleriopsis filiformis, Vischer: Changes

in cytochrome-f photooxydation and fluorescence induction kinetics

in press 1977

HILL, R. and BENDALL, F.:

Function of two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis

Nature 186, 136-137 (1960)

HIYAMA, T. and KE, B.:

Difference spectra and extinction coefficients  
of P-700

Biochim. Biophys. Acta 267, 160-171 (1972)

HOLDEN, M:

Chlorophylls

In: Chemistry and biochemistry of plant pigments  
(T.W. Goodwin ed.), Academic Press, London  
461-488 (1965)

HOWELL, S.H. and MONDRIANAKIS, E.N.:

Function of the "quantasome" in photosynthesis:  
structure and properties of membrane bound  
particle active in the dark reactions of photo-  
phosphorylation

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1261-1268 (1967)

IWANIJ, V., CHUA, N.-H and SIEKEVITZ, P:

Synthesis and turnover of ribulose biphosphate  
carboxylase and of its subunits during the cell  
cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*

J. Cell. Biol. 64, 572-585 (1975)

IZAWA, S. and GOOD, N.E.:

Effect of salts and electron transport on the  
conformation of isolated chloroplasts

II. Electron microscopy

Plant Physiol. 41, 544-552 (1966)

IZAWA, S., KRAAYENHOF, R., RUNGE, E.K. and  
DEVAULT, D.:

The site of KCN-inhibition in the photosynthetic  
electron transport pathway

Biochim. Biophys. Acta 314, 328-339 (1973)

JACOBI, G.:

Die photochemische Aktivität von Ultraschall-desintegrierten, isolierten Chloroplasten  
Z. Pflanzenphys. 57, 255-268 (1967)

JACOBI, G. und LEHMANN, H.:

Die funktionelle und strukturelle Beurteilung von Fragmenten ultraschall-behandelter Chloroplasten  
Z. Pflanzenphysiologie 59, 457-476 (1968)

JEFFREY, S.W.:

Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae  
Biochim. Biophys. Acta 162, 271-285 (1968)

KAN, K.-S. and THORNER, J.P.:

The light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of *Chlamydomonas reinhardtii*  
Plant Physiol. 57, 47-52 (1976)

KE, B., SAHU, S., SHAW, E., BEINERT, H.:

Further characterisation of a photosystem II particle isolated from spinach chloroplasts by triton treatment. The reaction-center components  
Biochim. Biophys. Acta 347, 36-48 (1974)

KE, B. and SHAW, E.:

Reconstitution of photosystems I and II using, spinach subchloroplast fragments fractionated by triton treatment  
Biochim. Biophys. Acta 275, 192-198 (1972)

- KESSLER, E., ARTHUR, W. and BRUGGER, J.E.:  
The influence of manganese and phosphat on  
delayed light emission, fluorescence, photo-  
reduction and photosynthesis in algae  
Arch. Biochem. 71, 326-335 (1957)
- KRATZ, W.A. and MYERS, J.:  
Nutrition and growth of several blue-green algae  
Amer. J. Bot. 42, 282-287 (1955)
- KOK, B. and RURAINSKI, H.J.:  
Long-wave absorption and emission bands in  
chloroplast fragments  
Biochim. Biophys. Acta 126, 584-587 (1966)
- KOK, B. and DATKO, E. A.:  
Reducing power generated in the second photoact  
of photosynthesis  
Plant Physiol. 40, 1171-1177 (1965)
- KUHL, A. and LORENZEN, H.:  
Handling and culturing of Chlorella. Methods  
in cell physiology; Vol. I, 159-187. D.M. Press-  
cott ed.; Academic Press, New York (1964)
- LORENZEN, H.:  
Die photosynthetische Sauerstoffproduktion  
wachsender Chlorella bei langfristig inter-  
mittierender Belichtung.  
Flora (Jena) 147, 382-404 (1959)
- LORENZEN, H.:  
Synchronous cultures  
In: Photobiology Microorg., P. Halldal ed.,  
Willey, London 1970, 187-212

LORENZEN, H. and HESSE, M.:

Synchronous cultures

In. Alga Physiology and Biochemistry, W.D.P.

Stewart ed., 894-908 (1974)

LIEN, T. and KNUTSEN, G.:

Synchronised cultures of a cell-wall-less  
mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*

Arch. of Microbiology 108, 189-194 (1976)

MAC KINNEY, G.:

Absorption of light by chlorophyll solution

J. Biol. Chem. 140, 315-322 (1941)

MARSHO, T.V. and KOK, B.:

Detection and Isolation of P 700

In: Methods in Enzymology, XXIII, Photosynthesis

A.San Pietro ed., Academic Press, New York

(1971) 515-523

MELL, V.:

Herstellung subzellulärer, photosynthetisch  
aktiver Chloroplastenpartikel aus einzelligen  
Grünalgen

Staatsexamensarbeit, Universität Marburg 1974

METZNER, H., RAU, H. und SENGGER, H.:

Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit einzelner  
Pigmentmangel-Mutanten von *Chlorella*

Planta (Berl.) 65, 186-194 (1965)

MOLLOY, G.R. and SCHMIDT, R.R.:

Studies on the regulation of ribulose - 1,5 -di-  
phosphate carboxylase synthesis during the cell  
cycle of the eucaryote *Chlorella*

Biochim. Biophys. Res. Commun. 40, 1125-1133 (1970)

MÖLLER, M. und SENGER, H.:

Photosyntheseleistung synchroner Kulturen  
von *Cyanidium caldarium*

Ber. Deut. Bot. Ges. 85, 391-400 (1972)

MÜHLETHALER, K., MOOR, H. and SZARKOWSKI, J.W.

The ultrastructure of the chloroplast lamellae  
*Planta* 67, 305-323 (1965)

MYERS, J. and GRAHAM, J.:

Photosynthetic unit size during the synchronous  
life cycle of *Scenedesmus*

*Plant Physiol.* 55, 686-688 (1975)

NELLE, R., TISCHNER, R., HARNISCHFEGGER, G. and  
LORENZEN, H.:

Correlation between pigment systems and photo-  
synthetic activity during the developmental  
cycle of *Chlorella*

*Biochem. Physiol. Pflanzen* 167, 463-472 (1975)

NELSON, N.:

Structure and function of chloroplast reaction  
center

Vorgetragen in Zürich; Tagung d. Deut. Bot.  
Ges. 1976

OGAWA, P. and VERNON, L.P.:

Properties of partially purified photosynthetic  
reaction centers from *Scenedesmus* mutant 6 E and  
*Anabaena variabilis* grown in the presence of  
diphenylamine

*Biochim. Biophys. Acta* 197, 292-301 (1970)

OHKI, R. and TAKAMIYA, A.:

Improvement in separation of system I and II particles of photosynthesis obtained by digitonin treatment

Biochim. Biophys. Acta 197, 240-249 (1970)

OKAYAMA, S. and BUTLER, W.L.:

Extraction and reconstitution of PS II  
Plant Physiol. 49, 769-774 (1972)

OSAFUNE, T., MIHARA, S. HASE, E. and OHKURO, I.

Electron microscope studies on the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardtii dangeard in synchronous culture. I. Some characteristics of changes in subcellular structures during the cell cycle, especially in formation of giant mitochondria

Plant Cell Physiol. 13, 211-227 (1972)

OUITRAKUL, R. and IZAWA, S.:

Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. II. Acceptor-specific inhibition by KCN  
Biochim. Biophys. Acta 305, 105-118 (1973)

PARK, R.B. and PHEIFHOFER, A.O.:

Ultrastructural observation on deep-etched thylakoids

J. Cell Sci. 5, 299-312 (1969)

PARK, R.B. and PHEIFHOFER, A.O.:

The continued presence of quantasomes in ethylenediaminetetraacetate-washed chloroplast lamellae

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 60, 337-343 (1968)

PARK, R.B. and SANE, P.V.:

Distribution of function and structure in  
chloroplast lamellae

Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 395-430 (1971)

PFAU, J., WERTHMÜLLER, K.-J. and SENGER, H.:

Permanent automatic synchronisation of micro  
algae achieved by photoelectrically controlled  
dilution

Arch. Microbiol. 75, 338-345 (1971)

PHUNG NHU HUNG, S., REMY, E. and MOYSE, A.:

Cytochromes and lamellar proteins of greening  
barley etioplasts

Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971  
2407-2416

PRATT, L.H. and BISHOP, N.J.

Chloroplast reactions of photosynthetic mutants  
of *Scenedesmus obliquus*

Biochim. Biophys. Acta 153, 664-674 (1968)

Pyliotis, N.A. GOODCHILD, D.J. and GRIMME, L.H.:

The regreening of nitrogen-deficient *Chlorella*  
*fusca*. II. Structural changes during synchronous  
regreening

Arch. Microbiol. 103, 259-270 (1975)

ROBINSON, S.P. and WISKICH, J.T.:

The effects of digitonin on photochemical  
activities of isolated chloroplasts

Plant Physiol. 55, 163-167 (1975)

ROBINSON, S.P. and WISKICH, J.T.:

Effects of digitonin concentration on electron  
transport, phosphorylation, and proton uptake  
by subchloroplast particles

Plant Physiol. 56, 535-539 (1975)

ROWELL, P. and POWLS, R.:

A mutant strain of *Scenedesmus obliquus*  
deficient in ribulose diphosphate carboxylase,  
cytochrome f and photosystem II activity  
*Biochim. Biophys. Acta* 423, 65-79 (1976)

SANE, P.V. and PARK, R.B.

Further properties of stroma lamellae photo-  
system I  
*Proc. Int. Congr. Photosynth. Res.* 1971,  
825-832 (1972)

SANE, P.V., GOODCHILD, D.J. and PARK R. B.:

Characterization of chloroplast photosystem  
I and II separated by a non-detergent method  
*Biochim. Biophys. Acta* 216, 162-178 (1970)

SCHLÖSSER, G.U., SACHS, H., ROBINSON, D.G.:

Isolation of protoplasts by means of a  
"species-specific" autolysine in *Chlamydomonas*  
*Protoplasma* 88, 51-64 (1976)

SCHOR, S., SIEKEVITZ, P. and PALADE, G.E.:

Cyclic changes in the thylakoid membranes of  
synchronized *Chlamydomonas reinhardtii*  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 174-180 (1970)

SENGER, H.:

Änderungen im Photosynthesemechanismus während  
des Entwicklungszyklus synchron wachsender  
Grünalgen  
Habilitationsschrift der Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Universität Marburg (1968)

SENGER, H.:

Charakterisierung einer Synchronkultur von *Scenedesmus obliquus*, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthesequotienten während des Entwicklungszyklus *Planta* 90, 243-266 (1970a)

SENGER, H.:

Quantenausbeute und unterschiedliches Verhalten der beiden Photosysteme des Photosyntheseapparates während des Entwicklungsablaufes von *Scenedesmus obliquus* in Synchronkulturen *Planta* 92, 327-346 (1970b)

SENGER, H.:

Quantum yield and the emerson enhancement effect  
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971, 723-730

SENGER, H.:

Quantum yield of photosynthesis in synchronous cultures of algae  
In: Proc. 1st. Eur. Biophys. Congr., E. Broda, A. Locker and H. Springer-Lederer, ed., 33-36 Wiener Medizin. Akad. Wien 1971

SENGER, H.:

Sensitivity changes to photosynthetic inhibitions  
in press, 1976 oder 1977

SENGER, H.:

Changes in photosynthetic activities in synchronous cultures of *Scenedesmus*, *Chlorella* and *Chlamydomonas*. Les Cycles Cellulaires et leurs Blocages, publ. C.N.R.S., Paris 1975

SENGER, H. and BISHOP, N.I.:

Changes in fluorescence and absorbance during  
synchronous growth of *Scenedesmus*

Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971  
678-687 (1972)

SENGER, H. and BISHOP, N.I.:

Light-dependent formation of nucleic acids  
and its relation to the induction of synchronous  
cell division in *Chlorella*

In: The Cell Cycle, 179-202, Academic Press. Inc.  
New York 1969 a

SENGER, H., BISHOP, N.I.:

Changes in the quantum yield and photoreduction  
during the synchronous life cycle of *Scenedesmus*  
*obliquus*

Nature 214, 140-142 (1967)

SENGER, H. and BISHOP, N.I.:

Changes in fluorescence and absorbance during  
synchronous growth of *Scenedesmus*

Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971, 677-  
687

SENGER, H. und MELL, V.:

Preparation of photosynthetically active  
particles from synchronized green algae

In: Methods in Cell Physiology (D.M. Prescott ed.)  
Vol. XII, Academic Press, N.Y. (1976) 201-220

SENGER, H., BISHOP, N.I., WEHRMEYER, W. and  
KULANDAIVELU, G.

Development of structure and function of the  
photosynthetic apparatus during light-dependent  
greening of a mutant of *Scenedesmus obliquus*  
Rehovot 1913-1923 (1974)

SENGER, H., PFAU, J. and WERTHMÜLLER, K.-J.:  
Continuous automatic cultivation of homo-  
continuous and synchronized microalgae  
In: Methods in Cell Physiology, Vol. V,  
301-323 (1972), Academic Press Inc., New York  
and London 1972

SELMAN, B.R. and BANNISTER, T.T.  
Trypsin inhibition of photosystem II electron  
transport  
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 1971, 577-586  
(1972)

SÖDER, C.J.:  
Elektronenmikroskopische Untersuchung an unge-  
teilten Zellen von *Chlorella fusca*, Shihira et Krauss  
Arch. Mikrobiol. 47, 311-324 (1964)

SOROKIN, C. and KRAUSS, R.W.:  
Relative efficiency of photosynthesis in the  
course of cell development  
Biochim. Biophys. Acta 48, 314-319 (1961)

STEINBACK, K.E. and GOODENOUGH, U.W.:  
Morphological and photosynthetic properties  
of digitonin-treated chloroplast membranes from  
the wild-type and ac-5 strains of *Chlamydomonas*  
*reinhardtii*  
Plant Physiol. 55, 864-869 (1975)

STRASBERGER, G.:  
Die Entwicklung des Photosyntheseapparates der  
Pigmentmutante C-6D von *Scenedesmus obliquus*  
unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der  
lichtabhängig gebildeten Carotinoide  
Dissertation, Marburg 1977

STROTMANN, H. und von GÖSSELN, Ch.:  
Photosystem I-abhängige Phosphorylierung  
isolierter Chloroplasten mit Ascorbat /  
2.6. Dichlorphenolindophenol als Elektronen-  
donator und Methylviologen als Elektronen-  
akzeptor.  
Z.Naturforsch. 276, 445-455 (1972)

TAMIYA, H.:  
Growth and cell division in Chlorella.  
In: Synchrony in cell division and growth  
(E.Zeuthen ed.), 247-305, New York:  
Interscience 1964

THEISS-SEUBERLING, H.-B.  
Tagesverlauf der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-  
3-Phosphat-Dehydrogenase in synchroner Kultur  
der einzelligen Grünalge Ankistrodesmus braunii  
und seine Beeinflussbarkeit durch Röntgenstrahlen  
und Hemmstoffe der Proteinsynthese  
Arch. Microbiol. 104, 139-146 (1975)

THORNER, J.P.:  
Chlorophyll-proteins: light-harvesting and  
reaction center components of plants  
Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 127-158 (1975)

THORNER, J.P., GREGORY R.P.F., SMITH, C.A.  
and LEGGETT-BAILEY, J.:  
Studies on the nature of the chloroplast  
lamellae I. Preparation and some properties  
of two chlorophyll-proteincomplexes  
Biochemistry 6, 391-396 (1967)

TROSPER, T. and ALLEN, F.C.:  
Carotenoid composition of Spinach chloroplasts  
grana and stroma  
Plant Physiol. 51, 584-585 (1973)

VERNON, L.P. and SHAW, E.R.:

Photochemical activities of spinach chloroplasts following treatment with the detergent Triton X-100

Plant Physiol. 40, 1269-1277 (1965)

VERNON, L. P. and SHAW, E.R.

Photoreduction of 2,6-Dichlorephenolindophenol by Diphenylcarbazon: A photosystem II reaction catalyzed by tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragments

Plant Physiol. 44, 1645-1649 (1969)

VERNON, L.P., SHAW, E.R., OGAWA, T. and RAVEED, D.:

Structure of photosystem I and photosystem II of plant chloroplasts

Photochem. Photobiol. 14, 343-357 (1971)

WARBURG, O.:

Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen.

Biochem. Zeitschrift 100, 230-270

WEHRMEYER, W.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur präparativen Gewinnung einer Granafraktion aus isolierten Chloroplasten

Z.Naturforsch. 17 b, 54-57 (1962)

WESSELS, J.S.C. and VAN LEEUWEN, M.J.F.:

Abstracts colloquium on bioenergetics: Energy transduction in respiration and photosynthesis Pugnochioso, Italy, 1970, 39

WESSELS, J.S.C. and BORCHERT, M.T.:

Studies on subchloroplast particles

Proc. Int. Congr. Photosynth. 3rd. (1974), 473-484

WESSELS, J.S.C. and VOORN, G.

Photochemical activities of chloroplast fragments obtained by the action of digitonin  
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971  
833-845 (1972)

WESSELS, J.S.C. and VAN ALPHEN-VAN WAVEREN, O.  
and VOORN, G.

Isolation and properties of particles containing the reactioncenter complex of photosystem II from spinach chloroplasts  
Biochim. Biophys. Acta 292, 741-752 (1973)

WILLIAMS, J. L.:

A study on the carotenoids of wild-type and mutant strains of the algae *Scenedesmus obliquus*  
Masters Thesis, Oregon, University USA, 1971

WISSIG, E.

Die Wechselwirkung vom photosynthetischen Elektronentransport und der Aktivität von RuDP  
1,5-Diphosphatcarboxylase während der synchronen Entwicklung von *Scenedesmus obliquus*  
Diplomarbeit, Universität Marburg, 1977

YENTSCH, C. and GUILLARD, R.G.:

The absorption spectrum of chlorophyll in vivo  
Photochem. Photobiol. 2, 355-388 (1969)

MICHEL, J.M. and MICHEL-WOLWERTZ, M.R. :

On the fraction of the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts  
In: Prog. in Photosynth. Research, Vol. I;  
H. Metzner ed., Tübingen (1969) 115-127

Die vorliegende Arbeit entstand im Fachbereich  
Biologie-Botanik der Philipps-Universität  
Marburg/Lahn.

Herrn Prof. Dr. H. Senger danke ich für die  
Themenstellung, die intensive Betreuung und groß-  
zügige Unterstützung der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn G. Straßberger  
für zahlreiche Diskussionen während der Arbeit  
und der intensiven Zusammenarbeit bei der  
Carotinoid-Analyse. Herrn Dr. R. Powls danke  
ich für die Einarbeitung in die Protein-Iso-  
lierung und zahlreiche Anregungen.

Weiterhin danke ich Frau G. Müller für die  
Betreuung der Algenkulturen. Frau A. Altmann,  
Frau I. Koß und Herrn A. Geiger danke ich für  
die Mithilfe bei der Durchführung einiger  
Experimente; und Herrn Becker für die graphische  
Darstellung der Ergebnisse.

Bei Frau I. Krieger und meiner Frau E. Mell-Aust  
möchte ich mich besonders für ihren Einsatz bei  
der schriftlichen Fixierung der Arbeit bedanken  
und schließlich danke ich allen Mitarbeitern der  
Arbeitsgruppe Senger sowie den Angehörigen des  
FB Biologie, die mich während meiner Arbeit unter-  
stützt haben.

Der Philipps-Universität Marburg und dem Fach-  
bereich Biologie danke ich für die Gewährung  
eines Graduiertenstipendiums zur Promotions-  
förderung, wodurch mir ein weiterführendes  
Studium ermöglicht wurde.

Meine akademischen Lehrer waren:

Berndt, Bertsch, Bock, Bohnsack, Buchholtz,  
Cleffmann, Dehnicke, Diederich, Dimroth,  
Fischer, Follmann, Geyer, Henßen, Kellner,  
Kessel, Kindl, Kirchner, Klafky, Koch,  
Koecke, Kowallik, Lenski, Lütke, Müller,  
Nöth, Nultsch, Pfeil, Remane, Schmid,  
Schönbohm, Scriba, Seidelmann, Seitz, Senger,  
v. Stosch, Walcher, Wehrmeyer, Werner.

## LEBENS LAUF

- 11.5.1950 geboren in Melsungen als Sohn  
des Verwaltungsangestellten  
Wilhelm Mell und seiner Ehefrau  
Annemarie, geb. Reibold
- 1956 - 1960 Besuch der Stadtschule Melsungen
- 1960 - 1966 Besuch der Realschule Melsungen
- 1966 - 1968 Besuch der Geschwister-Scholl-Schule  
in Melsungen bis zur Erlangung  
des Abiturs
- 1968 - 1975 Studium der Fächer Biologie und  
Chemie an der Philipps-Universität  
Marburg/Lahn
- Januar 1975 Wissenschaftliche Prüfung für das  
Höhere Lehramt (Staatsexamen)
- Ab Februar 1975 Anfertigung einer Dissertation am  
FB Biologie der Universität Marburg
- 25.9.1975 Eheschließung mit Evelyne Aust







City Schnelldruck, Marcusstraße 10, 8700 Würzburg